

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la aclimatación a la tensión de oxígeno ambiente
en el desarrollo de *Discoglossus pictus pictus* (Otth)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Gustavo Barja de Quiroga

DIRECTOR:

Mercedes Alonso Bedate

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310034080

BAK
est

TESIS DOCTORAL

Estudio de la aclimatación a la tensión de oxígeno ambiente en el desarrollo de *Discoglossus pictus pictus* (Oth).

Autor:

**D. Gustavo Barja de
Quiroga Losada**

Gustavo Barja de Quiroga Losada

Director:

**Da. Mercedes Alonso
Bedate**

M. Alonso



R. 27.212

El presente trabajo de investigación se ha llevado a cabo en la Cátedra de Fisiología Animal, bajo la dirección de la Doctora Da. Mercedes Alonso Bedate. Deseo expresar mi reconocimiento a ella y al Catedrático, D. Arsenio Fraile Ovejero, por su apoyo, orientación e interés.

Quisiera también agradecer las sugerencias y ayudas prestadas por el Profesor D. Ignacio Núñez de Castro, un agradecimiento especial al Profesor D. Jorge de Costa y al Departamento de Oncología del Ministerio de Sanidad, así como a los compañeros de la Cátedra y de la Facultad. Gracias también a Araceli Gallego, así como a Dori Núñez por el trabajo mecanográfico y muchas cosas más.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
I Efecto de la tensión de oxígeno ambiente sobre los organismos animales.	
1.-Aclimatación a la hipoxia	
A.-Respuestas comportamentales y morfológicas	
A.1.- Comportamiento.....	4
A.2.- Respuestas morfológicas.....	6
B.- Transporte de gases del medio ambiente a los tejidos	
B.1.- Consumo de O ₂ y tensión de O ₂ ambiente.....	7
B.2.- Respuestas ventilatorias y circulatorias a la hipoxia.....	10
B.3.- Efecto de la hipoxia sobre el transporte sanguíneo de O ₂ ..	15
C.- Cambios moleculares y microestructurales	
C.1.- Cambios microestructurales.....	22
C.2.- Cambios moleculares.....	25
2.-Efecto de la hiperoxia.....	34
II El metabolismo celular durante el desarrollo de los anfibios	
1.- Desarrollo embrionario.....	39
2.- Desarrollo larvario.....	43
III Lactato deshidrogenasa	
1.- Propiedades generales.....	45
2.- La LDH y el polimorfismo bioquímico.....	50
3.- Isoenzimas LDH y filogenia.....	56
4.- Isoenzimas, LDH y ontogenia	
A.- Actividad total y específica.....	62
B.- Isoenzimas.....	66
5.- Función fisiológica de la LDH y tensión de O ₂	70
A.-Distribución tisular.....	71
B.-Inhibición por substrato.....	73

C.- Especies buceadoras.....	77
D.- Aclimatación y aclimatización a la tensión de O ₂	78
6.- La LDH en los procesos patológicos.....	81
7.- Localización de la LDH	
A.- Localización subcelular.....	85
B.- Localización histoquímica.....	88
OBJETIVOS.....	95
MATERIAL Y METODOS.....	97
I Materiales	
1.- Productos.....	98
2.- Aparatos.....	99
3.- Animales de experimentación	
A.- Animales adultos.....	100
B.- Desarrollo embrionario.....	106
C.- Desarrollo larvario.....	109
II Métodos	
1.- Control de la tensión de O ₂	113
2.- Consumo de O ₂	116
3.- Medida de la actividad relativa de las isoenzimas LDH	
A.- Preparación de muestras.....	118
B.-Preparación de los geles.....	120
C.- Electroforesis.....	123
D.- Cinética de las isoenzimas.....	127
4.- Medida de las actividades total y específica LDH.....	130
5.- Localización histoquímica de la LDH.....	134
6.- Microscopia electrónica.....	138
7.- Métodos estadísticos.....	142

RESULTADOS.....	152
I Heterogeneidad de la LDH	
1.- Movilidad electroforética.....	153
2.- Cruzamientos.....	159
3.- Distribución de frecuencias de los tres fenotipos.....	168
4.- Actividades y K_M de la LDH en los tres fenotipos.....	172
II Consumo de O_2 en relación con la tensión de O_2 ambiente	
1.- Larvas no aclimatadas.....	180
2.- Larvas aclimatadas.....	189
III Efecto de la tensión de O_2 ambiente sobre la ultraestructura del músculo caudal.....	192
IV Dimensiones corporales y comportamiento en la aclimatación a la tensión de O_2 ambiente	
1.- Longitudes y pesos.....	204
2.- Comportamiento.....	208
V Actividades de la LDH	
1.- Actividades total y específica en la aclimatación a la tensión de O_2 ambiente.....	209
2.- Actividad relativa de las isoenzimas en la aclimatación a la tensión de O_2 ambiente.....	211
3.- Actividad de la LDH durante el desarrollo embrionario.....	230
4.- Actividad de la LDH durante el desarrollo larvario.....	235
VI Efecto del ácido oxámico sobre el desarrollo embrionario.....	240
VII Localización histoquímica de la LDH durante el desarrollo embrionario.....	246

DISCUSION.....	253
CONCLUSIONES.....	284
BIBLIOGRAFIA.....	288

INTRODUCCION

I=N=T=R_O=D_U=C=C_I_O=N

Parece hoy en día bastante probable que la evolución biológica comenzó en una época en que la tierra tenía una atmósfera reductora, de forma que la síntesis de las primeras sustancias orgánicas ocurrió en condiciones anaerobias. Se supone entonces, que los primeros organismos utilizaron un metabolismo anaerobio como medio de obtención de energía. Sólo después, y gracias a la fotosíntesis, la atmósfera terrestre fue aumentando su contenido en oxígeno hasta llegar a la situación actual. Este cambio químico gradual se fue reflejando en la evolución biológica, de forma que gran número de especies, no sólo desarrollaron los medios para protegerse de este nuevo elemento altamente oxidante, sino que lo incorporaron a su maquinaria celular para extraer energía más eficientemente mediante el metabolismo aerobio. Sin embargo, existen bastantes especies, como los microorganismos o los parásitos intestinales, que siguen teniendo un metabolismo anaerobio como único medio de extracción de energía. De entre todos los grupos animales, los vertebrados han explotado al máximo el metabolismo aerobio, aunque reteniendo una capacidad limitada para obtener energía de modo anaerobio en situaciones extremas o de pobreza de oxígeno en el medio.

El metabolismo aerobio supone entonces una dependencia respecto al oxígeno, que limita la distribución de muchas especies en

ciertas áreas tales como la grandes alturas, las profundidades acuáticas o zonas que, como las aguas estancadas, suponen una pobreza en oxígeno. La persistencia en mayor o menor grado de un metabolismo anaerobio relativamente eficiente determina la capacidad mayor o menor de las distintas especies para vivir en esos hábitats o al menos, para sobrevivir durante un lapso de tiempo en condiciones desfavorables respecto al oxígeno. En esta situación, los poiquiloterms, al poder mantener tasas metabólicas más bajas que las de los mamíferos o las aves, gozan de una mayor independencia respecto al oxígeno. Por otra parte, si la falta de oxígeno es un factor limitante en el reino animal, es conocido que su administración en dosis superiores a las normales puede tener efectos deletéreos o incluso letales. Consecuentemente, las distintas especies animales han desarrollado varios mecanismos protectivos contra este elemento, el oxígeno, que en condiciones normales suministra las tasas más altas de energía, que posibilitan el enorme grado de actividad de los vertebrados.

I.- EFECTO DE LA TENSION DE OXIGENO AMBIENTE SOBRE LOS ORGANISMOS ANIMALES.

1.- Aclimatación a la hipoxia.

Usamos aquí el término aclimatación para referirnos a las adaptaciones que ocurren durante el período de vida de un individuo, que necesitan horas o semanas para realizarse y que se producen en respuesta a la manipulación de la tensión de oxígeno ambiente en el laboratorio. Cuando estas mismas adaptaciones se dan en la naturaleza, se mencionan como aclimatizaciones. Dos categorías más de respuestas serían las adaptaciones inmediatas o acomodaciones, que ocurren instantáneamente, y las adaptaciones evolutivas, que implican la adquisición de nuevo material genético a lo largo de la filogenia. Esta nomenclatura ha sido descrita por Hochachka y Somero (1973) y es la universalmente aceptada por los especialistas en fisiología ambiental.

A.- Respuestas comportamentales y morfológicas.

A.1.- Comportamiento.

La respuesta más común entre los vertebrados a las condiciones de hipoxia, es la huida hacia zonas de mayor tensión de O_2 . Cuando este comportamiento no es realizable, se utilizan otras alternativas. En el caso de algunos peces se pasa a

la respiración aérea si son pulmonados, o se utiliza incluso en ocasiones, la ventilación aérea de las branquias. En muchas especies se recurre a ascender para respirar, a la película de agua superficial, que normalmente es más rica en oxígeno. Este comportamiento ha sido descrito por Gee (1976) en especies tropicales y por Tramer (1977) en peces de aguas templadas. Recientemente Gee et al. (1978) han realizado un amplio estudio en 26 especies y ocho familias de Teleosteos, concluyendo que a excepción de Stizostedion vitreum y tres especies de salmonoideos, todos los peces estudiados acudían a la lámina de agua superficial a respirar, cuando el medio acuático se hacía hipóxico, por debajo de los 50 mm Hg de O₂. Según Lewis (1970) sin embargo, el tipo de respuesta depende de la especie, pudiéndose distinguir en este sentido cuatro categorías de peces, desde los inadaptados hasta los completamente adaptados.

El caso de los anfibios es diferente, ya que se puede decir que son los vertebrados más plásticos desde el punto de vista del intercambio respiratorio, al disponer hasta de cuatro superficies respiratorias distintas: branquias, piel, pulmones y epitelio bucofaringeo. La existencia de pulmones en las larvas prometamórficas de los anfibios posibilita la toma de aire como respuesta a la hipoxia. Este comportamiento parece ser general en las larvas de anfibios tanto en periodos de actividad intensa (Bennet y Licht, 1974), como de hipoxia (Branch y Taylor, 1977). Este último autor, cita también

un tercer tipo de respuesta a la hipoxia, la quiescencia, en las larvas premetamórficas de Ambystoma maculatum.

A.2.- Respuestas morfológicas

Una de las alteraciones compensatorias mejor establecidas en las larvas de anfibios respecto a la tensión de oxígeno, se refiere al aparato branquial. La primera referencia es de Babák (1907) quien describió un aumento del tamaño de las branquias de Rana fusca cuando las larvas crecían en agua saturada con una mezcla de gases con concentración de oxígeno inferior a la del aire atmosférico. Esta observación fue confirmada por Drastich en 1925 en Salamandra maculosa, y por Bond (1960) en tres especies del género Salamandra. El aumento en tamaño de las branquias, según este último autor, se debería a variaciones en la forma de las células más que a un aumento de su número. De todas formas, se detectó un aumento de la actividad mitótica en hipoxia. Según Drastich y Bond, además, cuando las larvas se desarrollan en agua equilibrada con oxígeno puro, el efecto es el contrario, es decir, que las branquias se reducen, mientras que el índice mitótico se mantiene constante. Boell et al. (1963) han estudiado la contribución de las branquias a la respiración global mediante experimentos de extirpación en Ambystoma punctatum. En condiciones de normoxia o de hipoxia moderada (entre 151 y 76 mm Hg O₂), el consumo de oxígeno no varía entre animales con o sin branquias, pero en hipoxia extrema (38 mm Hg O₂), el consumo de oxígeno

es menor en las larvas sin branquias. Así, la importancia de las branquias en la respiración estaría muy aumentada en condiciones de hipoxia extrema.

Se ha descrito también un descenso del crecimiento en hipoxia, en el desarrollo de otras especies como Acheta domestica (Woodring et al., 1978), la rata de laboratorio (Hock, 1970) o incluso el hombre (Stinson, 1980). Así, al llevar ratas de 30 días a una altura de 4.000 metros (hipoxia hipobárica), comienza a disminuir el crecimiento al cabo de 90 días y éste efecto actúa también en los fetos de las hembras gestantes. Boell et al. (1963) encontró también un retraso en el desarrollo, disminución de la viabilidad y anomalías morfológicas en larvas sin branquias de Ambystoma punctatum cuando se desarrollaban en agua con 38 mm Hg O₂. No hubo, sin embargo, diferencias en el crecimiento ni en la ingestión de alimento, en larvas normales desarrolladas a 76 mm Hg O₂, con respecto a larvas control.

B.- Transporte de gases del medio ambiente a los tejidos.

B.1.- Consumo de oxígeno y tensión de oxígeno ambiente.

Normalmente, los poiquiloterms acuáticos responden a las variaciones en la tensión de oxígeno del agua con alteraciones en su consumo de oxígeno. La respuesta en muchos casos se puede dividir en dos fases. En una primera fase, el consumo

de oxígeno ($\dot{V}O_2$) no varía hasta que la tensión de oxígeno del agua llega a un valor crítico. A partir de este valor y hacia abajo, el $\dot{V}O_2$ comienza a descender. La primera fase suele llamarse rango de regulación y la segunda rango de conformismo. La tensión de oxígeno ambiente que separa ambas fases suele recibir el nombre de tensión crítica. Sin embargo, hay casos en los que estas dos fases teóricas no corresponden bien a la realidad, bien porque el descenso de $\dot{V}O_2$ sea muy lento y progresivo o bien porque la tensión crítica tenga un valor muy alto. Debido a esto último, se suele llamar conformista respecto al oxígeno a toda especie cuya tensión crítica esté por encima de los 150 mm Hg O_2 . En caso contrario la especie sería reguladora. Normalmente, tienden a ser conformistas las especies de tamaño corporal más grande y menos activas, mientras que la regulación se encuentra con mayor frecuencia en las que viven en hábitats pobres en oxígeno (Hill, 1976).

La respuesta al oxígeno ambiente ha sido ampliamente estudiada en los peces y varía según las especies. Así, Carassius auratus sería una especie reguladora, ya que su etapa conformista no comienza hasta que la tensión de oxígeno del agua descende por debajo de los 34 mm Hg (Fry y Hart, 1948), mientras que en Salvelinus fontinalis la tensión crítica se encuentra por encima de los 200 mm Hg, por lo que sería una especie conformista (Job, 1955). Gee et al. (1978), han realizado recientemente un estudio en 24 especies de teleósteos, incluyendo fa

miliarias como los salmónidos, ciprínidos o pércidos, observando normalmente la existencia de regulación y tensiones críticas desde los 13 mm Hg de Semotilus margarita a los 48 mm Hg de Salvelinus alpinus.

En algunos casos se encuentra, además, otro punto de inflexión además de la tensión crítica. Así, en Pimephales promelas a 21°C, la etapa conformista se encuentra entre 1 y 4 ml O₂/l H₂O, y la etapa reguladora entre 4 y 9 ml O₂/l H₂O, pero cuando la concentración de oxígeno es superior a los 9 ml/l, el VO₂ vuelve a aumentar con relación al nivel de oxígeno en el medio (Wares e Igram, 1979). Lo mismo ocurre en Salmo Gairdnerii, que es conformista por debajo de 150 mm Hg O₂, semi-regulador entre 150 y 250 mm Hg O₂ y de nuevo "conformista" por encima de este último valor (Laurent, 1975).

El tipo de respuesta depende también de la temperatura, del grado de actividad, y del nivel de aclimatación previo a la experiencia. Así, Carassius auratus se comporta como regulador, pero si se le fuerza a realizar una actividad máxima, se comporta como conformista. En esta misma especie se obtuvieron diferencias en el grado de respuesta entre los animales preaclimatados y no preaclimatados a las tensiones de oxígeno de medida cuando las pruebas se realizaron a 20°C, pero no las hubo cuando se realizaron a 10°C (Beamish, 1964).

Se han realizado también estudios en larvas de anfibios

que relacionan el $\dot{V}O_2$ con la tensión de oxígeno ambiente. Según Boell et al. (1963), las larvas de Ambystoma punctatum muestran un descenso leve de consumo de oxígeno entre los 760 y los 50 mm Hg de O_2 ambiente. A partir de 38 mm Hg y hacia abajo, hay un descenso abrupto del $\dot{V}O_2$. También Bond (1960), da un valor de 38 mm Hg como tensión de O_2 crítica en las larvas de Ambystoma opacum y de Ambystoma jeffersonianum. El estudio de D.L. Weigmann y Altie (1975), muestra que la resistencia a la hipoxia extrema depende de factores ontogénicos y específicos y que la preaclimatación de las larvas de Ambystoma opacum a la hipoxia disminuye el valor de la tensión de oxígeno crítica. El descenso de la temperatura disminuía también dicha tensión en Siren intermedia, Ambystoma maculatum y Ambystoma opacum. En Ambystoma maculatum, sin embargo, las larvas resultan ser conformistas mientras que los jóvenes recién metamorfoseados se comportan como reguladores a tensiones superiores a 88 mm Hg de O_2 . (Branch y Taylor, 1977). Las larvas de Rana pipiens son reguladoras hasta llegar a los 35 mm Hg de O_2 ambiente (Helff y Stubblefield, 1931).

B.2.- Respuestas ventilatorias y circulatorias a la hipoxia.

a) Respuesta ventilatoria.-

En los peces en general, la dismunición de la tensión de oxígeno en el agua circundante suele producir un aumento del

volúmen de ventilación, un aumento de la frecuencia respiratoria, una disminución de la frecuencia cardíaca y un ligero aumento del gasto cardíaco. Así, en la trucha el volúmen de ventilación puede aumentar hasta un valor siete veces más alto en hipoxia, mientras que el consumo de oxígeno ($\dot{V}O_2$) se mantiene constante entre 155 y 30 mm Hg de oxígeno en el agua (Davis y Cameron, 1971; Randall y Shetlon, 1963 y Randall, 1967). En Cyprinus carpio un descenso en la tensión de oxígeno del medio puede aumentar hasta 12 veces el volúmen de ventilación por minuto. Este aumento parece deberse sobretudo al incremento de la frecuencia de ventilación de las branquias (Itazawa y Takeda, 1978). En Salmo Gairdnerii y en Ictalurus melas se ha descrito también esta respuesta ventilatoria a la hipoxia (Laurent, 1973, 1975). El consumo de oxígeno suele mantenerse constante en hipoxia en la fase reguladora como es el caso de la trucha, pero en muchas otras especies como en Carassius auratus, su valor en hipoxia supera incluso al valor en normoxia. Cuando esto sucede la causa es el gasto de energía originado por la presencia de un esfuerzo ventilatorio extra. En estos casos, si la hipoxia se agudiza aún más, llega un momento en el que el beneficio obtenido con una ventilación aumentada no compensa el gasto extra de energía que esta misma ventilación origina, con lo que el animal debe recurrir a otros mecanismos para solucionar su problema de falta de oxigenación (Hughes y Umezawa, 1968).

En el caso de los anfibios, la respuesta es variable según

las especies. Xenopus laevis obtiene la mayor parte del oxígeno del aire, pero en otros anfibios la extracción más importante del oxígeno es a partir del agua por las branquias o la piel. En este último caso, si la tensión de oxígeno ambiente disminuye, la situación cambia. El caso más extremo está representado por la rana del lago Titicaca, Telmatobius culeus que obtiene todo su oxígeno a partir del agua hasta que la tensión de oxígeno (tO_2) cae por debajo de 60 mm Hg. Cuando esto ocurre, comienza a utilizar la ventilación pulmonar así como también realiza una serie de movimientos que ventilan una gran cantidad de pliegues cutáneos que posee (Hutchison et al., 1976). Aquí se produce también un aumento de la tasa metabólica que varios autores interpretan como producto del coste de la ventilación. No existen muchos datos referentes a la respuesta ventilatoria de los anfibios ante la hipoxia, pero el comportamiento regulador, frente al oxígeno observado en varias especies (Boell et al., 1963, Weigmann y Altig, 1975), parece indicar que esta respuesta existe a nivel de las branquias. El trabajo de Boell et al. (1963) en el género Ambystoma parece apuntar en este sentido, ya que la importancia de las branquias en la toma de oxígeno parece estar reservada a las tensiones de oxígeno que son calificables de hipóxicas. En cualquier caso, las larvas de anfibios muestran en general una respuesta similar a la de los adultos -a la respiración acuática se suma la aérea en hipoxia- siempre que el descenso de tO_2 esté limitado a la fase líquida (Branch y Taylor, 1977).

La respuesta ventilatoria a la hipoxia de los peces y los anfibios que respiran en el agua, está mediada, como en los mamíferos, por receptores tanto periféricos como centrales, aunque su localización es incierta. En las larvas de anfibios, como en la mayoría de los peces y muchos otros animales acuáticos estos receptores son sensibles al oxígeno, en vez de al CO_2 como ocurre en los vertebrados aéreos. De esta forma, un descenso de la $t\text{O}_2$ del agua provoca la respuesta ventilatoria, mientras que el aumento de la tensión de CO_2 no produce este efecto. Así, Siren lacertinia es insensible a tensiones de CO_2 tan altas como 280 mm Hg aunque en su medio natural no suelen encontrarse tensiones más altas de 60 mm Hg CO_2 (Ultsh, 1976). En caso de existir una sensibilidad al CO_2 , esta se produce a una tensión menor en los anfibios adultos que en las larvas. Los receptores periféricos implicados en la respuesta hiperventilatoria de los anfibios se localizan en el laberinto carotideo y están inervados por ramas de los nervios creaneales IX y X que llevan la sensación a centros respiratorios bulbares (Neil et al. 1950 y Randall 1977). De todas formas, en peces de agua dulce algo sensibles al CO_2 , tensiones de este gas del orden de 800 a 1.600 mm Hg pueden ser letales si la exposición es prolongada, pero en la naturaleza, incluso en aguas muy contaminadas, la $t\text{CO}_2$ no suele superar nunca los 300 mm Hg como máximo (Doudoroff y Katt, 1950). En los anfibios adultos sin embargo, sí hay receptores al CO_2 , tanto en el laberinto carotideo como en los pulmones y vías respirada

torias internas. Así, Rana pipiens presenta quimiorreceptores pulmonares que responden a tensiones de CO_2 semejantes a las que otros autores han encontrado en esta especie en condiciones fisiológicas (Milsom y Jones, 1977).

b) Respuesta circulatoria.-

Otra de las respuestas a la hipoxia bien documentada en los peces es la disminución de la frecuencia cardíaca (Satchell 1971) mediada vía nervio vago (Taylor et al., 1977). En un principio se pensó que esta bradicardia provocaría un descenso del gasto cardíaco y que así el tiempo que la sangre estaría en las branquias sería mayor, con lo cual aumentaría el tiempo de difusión para el intercambio de gases, lo que resultaría ventajoso en condiciones de hipoxia (Satchell 1961). Sin embargo, se ha podido comprobar en varias especies como la trucha (Randall et al., 1967) o el pez-perro Scyliorhinus canícula (Butler y Taylor, 1975), que en realidad no hay tal disminución del gasto, ya que la bradicardia se compensa con un aumento de la amplitud de la contracción cardíaca gracias a un mayor llenado del ventrículo. Así, el papel fisiológico de la bradicardia no está todavía bien esclarecido. Taylor et al. (1977), ha sugerido que su objetivo podría ser la disminución del coste energético de la contracción cardíaca, que sería favorable en condiciones de hipoxia. Por otra parte, el trabajo reciente de Short et al. (1979) en Scyliorhinus canícula muestra que la bradicardia es una respuesta inicial, ya que en la aclimatación a la hipoxia a largo plazo se recupera el ritmo normal

53/100 34 080

al cabo de 48 horas. Es posible entonces que la bradicardia represente una parte del stress hipóxico inicial y a largo plazo el organismo deriva hacia otras soluciones como las metabólicas, para hacer frente a la falta de oxígeno. En los anfibios se ha descrito también la disminución de la frecuencia cardíaca en hipoxia, apnea, o durante períodos de inmersión forzada (Jones 1967). La bradicardia observada en Rana pipiens (Lillo, 1979) se acompaña de un mantenimiento de la presión arterial, y es más gradual que en los vertebrados superiores. Normalmente, la bradicardia es más aguda en las especies más acuáticas como Xenopus laevis o Xenopus mulleri, aunque a veces esta situación se invierte, ya que Rana esculenta que es más acuática que Bufo bufo, muestra una bradicardia menos intensa que este último (Jones, 1967). En Rana esculenta la reducción de la frecuencia cardíaca es de un 20 a un 40% (Jones, 1972).

B.3.- Efecto de la hipoxia sobre el transporte sanguíneo de oxígeno.

En condiciones de hipoxia, una de las respuestas más notables de los poiquiloterms acuáticos durante la aclimatación, se refiere al transporte de oxígeno por el sistema circulatorio. Los parámetros sanguíneos más comunmente afectados son: el número y tamaño de los eritrocitos, la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre, la cantidad de hemoglobina, el valor hematocrito, la forma de la curva de disociación de la

hemoglobina y el efecto Bohr.

a) Recuento eritrocitario.-

Una de las respuestas a la hipoxia conocidas hace tiempo en la circulación sanguínea es el aumento del número de eritrocitos por unidad de volúmen de sangre. En los mamíferos, la respuesta común a la hipoxia suele ser el aumento del valor hematocrito y de la concentración de hemoglobina. Si la exposición se alarga durante semanas se producen aumentos en el número absoluto de eritrocitos (Bartels et al,1979). Si se produce una estimulación severa y persistente de la eritropoyesis, pueden llegar a cambiar también parámetros como la forma y el tamaño de los eritrocitos (Huff,et al.,1975).

En el caso de los anfibios, la literatura no es muy extensa en este respecto. En algunos casos se ha observado esta adaptación. Así, Friedman (1971) no pudo encontrar una correlación positiva entre el recuento eritrocitario y la variación altitudinal en tres poblaciones de Taricha granulosa. Quizás se deba esto a que la altura máxima era de 1.037 m, lo que puede suponer una presión selectiva no suficiente como para originar adaptaciones circulatorias. En este caso además, la situación se complicaba, ya que sí se detectaron variaciones estacionales. Un caso bien estudiado es el de la rana del lago Titicaca Telmatobius culeus, que está aclimatada a la vida a una altura de 3.812 m, lo que supone una tensión de oxígeno

en el agua de menos de 100 mm Hg. El número de eritrocitos presente en esta especie, $729 \times 10^3 / \text{mm}^3$ (Hutchison et al, 1976), es el más alto que se ha citado en los anuros. Este valor sólo lo sobrepasa dentro de los anfibios la salamandra Ambystoma tigrinum, con 1542×10^3 eritrocitos/ mm^3 que vive a 2.100 m de altura en las montañas rocosas (Roofe, 1961). También se ha descrito un aumento en el recuento eritrocitario en la salamandra Necturus maculosus en la aclimatación a la hipoxia. Cuando individuos de esta especie se llevan desde el nivel del mar hasta una altura que supone una tO_2 de 68 mm Hg, al cabo de siete semanas el número de eritrocitos pasa de 420×10^3 a $580 \times 10^3 / \text{mm}^3$, es decir, un aumento del 38% (Gordon, 1935). En Ambystoma tigrinum se ha descrito también policitemia en las larvas sujetas a ambientes hipóxicos (Wade y Rose, 1972). El aumento en el número de eritrocitos como respuesta a la hipoxia plantea, sin embargo, el problema del aumento de viscosidad de la sangre, que supone un aumento del coste energético de la circulación. Quizás se puede relacionar con esto el hecho de que el anuro con mayor recuento eritrocitario, Telmatobius culeus sea también el que posee los eritrocitos más pequeños ($394 \mu^3$).

Wassersug y Seibert (1975), han descrito también cambios en la cantidad relativa de vascularización de las distintas superficies respiratorias en larvas de anfibios, como respuesta a la hipoxia. Simultáneamente con las variaciones en el recuento, se han descrito también aumentos del valor hematocrito como res

puesta a la hipoxia en peces (Itazawa y Takeda, 1978; Weber et al., 1979) y anfibios (Roofe 1961; Hutchison et al., 1976; Howard y Wallace, 1980). La consecuencia más normalmente observada de estos aumentos en el número de eritrocitos y del valor hematocrito, es un aumento en la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre.

b) Hemoglobina.-

Se han descrito también aumentos en la cantidad de hemoglobina. En Cyprinus carpio se ha registrado un aumento de la cantidad de hemoglobina al someter a los animales a hipoxia severa (Itazawa y Takeda, 1978). Telmatobius culeus muestra también una concentración de hemoglobina, 8,1gr/100ml que es alta dentro de los anfibios, presentando también una concentración alta de hemoglobina celular ($0,281 \text{ pg}/\mu^3$) (Hutchison et al., 1976). En otras especies que pueblan las grandes alturas como Bufo bocourti, se dan los valores más altos de los anfibios, de 10,0 a 12,9 gr/100 ml (Stuart, 1951). Sin embargo, en algunos casos como en Ambystoma macrodactylum, las poblaciones de más altura muestran un aumento del valor hematocrito pero no de la hemoglobina (Howard y Wallace, 1980). Este autor interpreta este hecho como probablemente debido a la liberación a la circulación de eritrocitos inmaduros, lo cual se ha demostrado que ocurre como consecuencia de la falta de alimento en Necturus y Bufo (Chury 1952; Harvis 1953). La razón del aumento del hematocrito y de la hemoglobina es, sin embargo,

de carácter específico. Así, en Pleurodeles Waltlii se debe a un aumento del tamaño celular (Deparis et al, 1975), mientras que en Ambystoma tigrinum se origina como consecuencia de un recuento eritrocitario mayor (Roofe, 1961).

Otra característica de la hemoglobina de los anfibios se refiere a sus propiedades en la larva y en el adulto. Esta molécula presenta una movilidad electroforética diferente, en casi todas las especies estudiadas, antes y después de la metamorfosis. Esto se refleja en la curva de saturación del O_2 respecto a la hemoglobina. En los anfibios adultos, así como en la mayoría de los vertebrados, esta curva es sigmoidea. En el caso de las larvas de Rana, sin embargo, en todos los casos descritos se trata de una hipérbola rectangular y muy desplazada hacia la izquierda, es decir con una tensión de semisaturación, P_{50} , muy baja (Wolvekamp, 1932; McCutcheon, 1936 ; McCutcheon y Hall 1937; Riggs, 1951; Foxon, 1964). La P_{50} suele ser menor de 10 mm Hg de O_2 a 20°C. Esto supone una gran afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Este tipo de curva aparece con frecuencia en muchos invertebrados y su función sería la de proveer al organismo con una reserva de oxígeno que sólo sería cedida a los tejidos en circunstancias adversas. Podría ser también ventajosa en condiciones de hipoxia, ya que la hemoglobina seguiría transportando oxígeno aún a tensiones del mismo extremadamente bajas. Sin embargo, habría dificultades en la cesión del oxígeno a los te

jidos, a menos que estos se mantuviesen a tensiones de oxígeno aún más bajas. Otra característica muy interesante de la hemoglobina de las larvas de los anfibios es su extraordinaria estabilidad ante las variaciones de pH, de forma que el efecto Bohr es prácticamente inexistente. Así, la hemoglobina de las larvas de Rana catesbeiana no muestra casi ninguna variación en su afinidad por el oxígeno desde pH 9 a pH 5, mostrando una P_{50} de 6 mm Hg O_2 , mientras que en el adulto de la misma especie basta con que el pH varíe de 6,9 a 7,3 para que la P_{50} pase de 25 a 12,5 mm Hg de O_2 y a pH 8,4 presenta un valor de 8 mm Hg. Esta característica puede interpretarse como ventajosa, ya que las larvas de los anfibios suelen vivir en charcas de agua estancada en las que el contenido de oxígeno es bajo y el de CO_2 alto. El efecto Bohr sería desfavorable en estas condiciones ya que provocaría una disminución de la afinidad de la Hb por el oxígeno en un momento en el que se precisa una afinidad máxima (Schmidt-Nielsen, 1976).

La afinidad del oxígeno por la hemoglobina se ve también alterada en hipoxia. Benesh y Benesh (1967) y Chanutin y Curnish (1967) fueron los primeros en demostrar en el hombre que un aumento en la concentración del 2,3 difosfoglicerato de los eritrocitos, mueve la curva de disociación de la hemoglobina hacia la derecha, es decir, disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. En los mamíferos en condiciones de hipoxia, como consecuencia de la hiperventilación se produce un aumento del pH el cual a través de DPG-mutasa aumenta

la concentración de DPG. Por este mecanismo se ha observado que se produce una disminución de la afinidad Hb-O₂ en la aclimatización a la altura en los mamíferos. Esto sería ventajoso, ya que ayudaría a la liberación de oxígeno a los tejidos. Sin embargo, en alturas muy extremas esto llega a ser inadaptativo, ya que se puede llegar a una completa insaturación de la Hb en los pulmones. De hecho, las especies adaptadas a condiciones de hipoxia extrema o aclimatadas a ella, muestran el efecto contrario, un aumento de la afinidad Hb-O₂ y por tanto la curva de disociación está desplazada a la izquierda (Eaton et al., 1974; Heath y Williams, 1979). En el caso de los poiquilothermos, la hipoxia provoca un aumento de la afinidad Hb-O₂ moviendo la curva de disociación hacia la izquierda (Wood y Johansen, 1972; Weber et al., 1975 y 1979). Este aumento de afinidad se debe a la estimulación por la hipoxia de una disminución de la concentración de fosfatos orgánicos en el interior de los eritrocitos (Wood y Johansen, 1972). En los poiquilothermos, los fosfatos más importantes son sobre todo el GTP y también el ATP y el DPG. El descenso de la concentración de estos fosfatos tiene dos efectos. Por una parte se produce el efecto alostérico directo aumentando la afinidad Hb-O₂. Pero se da también un efecto indirecto, ya que el descenso de los fosfatos orgánicos eritrocitarios altera el equilibrio Donnan para los iones-incluyendo al H⁺- a través de la membrana, con lo que se produce un aumento del pH eritrocitario y por efecto Bohr un aumento también de la afinidad Hb-O₂ (Wood, 1980). Este efecto indirecto es el más importante

en condiciones de pH plasmático alto, pero no existe en las larvas de los anfibios al no poseer estas efecto Bohr.

Es raro que las variaciones de la hemoglobina como respuesta a la hipoxia sean algo más que cambios cuantitativos. Sin embargo, Vos et al. (1979) citan recientemente variaciones cualitativas en la hemoglobina de Artemia salina cuando se aclimata a tensiones de oxígeno bajas. Esta especie presenta tres tipos de hemoglobina con diferentes propiedades de afinidad por el oxígeno. La afinidad es máxima en la HbIII, intermedia en la HbII y menor en la HbI. La aclimatación a 32 mm Hg O₂ durante tres días provoca la aparición de la HbIII que normalmente no está presente.

C.- Cambios moleculares y microestructurales.

C.1.- Cambios microestructurales.

Las respuestas ventilatorias y circulatorias a la hipoxia sirven para compensar el déficit de oxígeno ambiente. Sin embargo, siempre existe un nivel de hipoxia lo suficientemente agudo como para que el plasma circulante no pueda suministrar a los tejidos la cantidad de oxígeno necesaria. En este caso se produce una hipoxia tisular. Los poiquilothermos pueden reaccionar con un descenso de la tasa metabólica, pero cuando se alcanza el nivel mínimo para el mantenimiento de las funciones vitales, sólo las reacciones a nivel de tejido pueden

permitir la supervivencia. Entre las variaciones morfológicas a nivel de tejido se ha descrito la hipertrofia del ventrículo izquierdo (Kinnula,1976), y en algunos casos también la hiperplasia de las células musculares cardíacas (Wachtlova et al.,1977), y cambios estructurales de la miosina cardíaca (Pelouch et al.,1980). En este último caso los cambios no eran adaptativos. La mayoría de los cambios microestructurales provocados por la hipoxia han sido estudiados en los mamíferos. Entre los más importantes están las variaciones en el nivel de capilarización de los tejidos. El aumento de la densidad y del diámetro de los capilares facilita el transporte de oxígeno desde la red capilar a las mitocondrias. El aumento en densidad disminuye la distancia de difusión y el aumento en diámetro incrementa el área para la misma. Este aumento de la capilarización se ha observado en el cerebro, corazón y músculo esquelético de rata, cobaya y perro en la aclimatación a las grandes alturas, llegando al 30-40% de incremento (Hill,1976).

Se han realizado numerosos estudios, la mayoría in vitro, sobre el efecto de la hipoxia, la anoxia y la isquemia, sobre las mitocondrias. En algunos casos la hipoxia produce la llamada tumefacción o turgescencia mitocondrial, caracterizada por un aumento del tamaño global y de la cámara externa, presencia de crestas acortadas o desaparecidas y la aparición de una matriz anormalmente clara y vacuolizada. Este cuadro se da también como consecuencia de otros fenómenos cuyo efecto

común es el trastornar la permeabilidad de la pared mitocondrial y en el caso de la hipoxia suele ser reversible. Si la permeabilidad mitocondrial aumenta mucho puede llegar a entrar glucógeno en el interior de las mitocondrias, como ocurre en el músculo cardíaco del perro después de media hora de anoxia total (Díaz-Flores, 1974; Maillet, 1975). En caso de isquemia in vivo y de anoxia in vitro, se ha observado también gigantismo mitocondrial y aparición de inclusiones intermembranas en el músculo esquelético y cardíaco (Karpati et al., 1974; Hanzlikova y Schiaffino, 1977). El gigantismo mitocondrial suele deberse a fusión de mitocondrias menores, pero también se puede originar por hinchamiento. De hecho, conforme disminuye el pH intracelular, las mitocondrias tienden a transformarse de alargadas en vesiculares. Las inclusiones intermembranas son de naturaleza proteica y se ha sugerido que podrían formarse por polimerización de enzimas (Farrel et al., 1972). Todas estas modificaciones no ocurren siempre y su aparición depende del grado de hipoxia. Así, el cultivo de fibroblastos y células epiteliales humanas in vitro a 23 mm Hg de O_2 , no produjo ninguna alteración en las mitocondrias ni en el resto de la ultraestructura celular en comparación con líneas celulares que crecieron en presencia de 152 mm Hg de oxígeno, aunque sí se observaron cambios bioquímicos que mostraban una reacción a la hipoxia (Schroeder et al., 1975). Sin embargo, las mitocondrias del músculo cardíaco de rata son lábiles in vitro en 7,6 mm Hg O_2 al cabo de 4 días (Wenz et al., 1975).

La cantidad y forma de acumulación del glucógeno varían también con la hipoxia. En Carassius auratus, al cabo de cinco días de anoxia, la cantidad de glucógeno hepático y muscular disminuye en un 50% y el tiempo de supervivencia es función de la cantidad de glucógeno almacenado (Hochachka, 1980). Es también importante el tipo de acumulación de glucógeno, que puede estar presente como partículas β (gránulos de 150-400 Å), partículas α o rosetas (aprox. 1.000 Å), cuerpos de glucógeno (formados por gránulos de 350 Å y asociados al retículo) y mares de glucógeno (formados por agrupaciones de gránulos de 300 Å). Las partículas β y especialmente los cuerpos de glucógeno están asociados con una capacidad glucolítica grande como la del músculo blanco de Thunnus thynnus. Los mares de glucógeno suelen encontrarse alrededor del núcleo celular y sólo se dan en músculos muy anaerobios como el de Lepidosiren paradoxa, no desapareciendo hasta que se hallan consumido los gránulos β , por lo que se piensa que su significado sería el de reservorios para situaciones anaerobias de emergencia (Hochachka y Hulbert, 1978).

C.2.- Cambios moleculares.

Las adaptaciones bioquímicas a la falta de oxígeno son menos conocidas que las fisiológicas. Estas adaptaciones que se producen en el curso de la aclimatación, se pueden originar por cambios en el tipo de macromoléculas presentes en los tejidos, por cambios en las concentraciones, o mediante la regu

lación de las funciones de las mismas. En el segundo caso se encuentran algunas variaciones en los niveles de mioglobina y de citocromo oxidasa, producidas por la hipoxia. Se ha supuesto recientemente que un aumento en la concentración de mioglobina muscular facilitaría la difusión del oxígeno desde los capilares hasta las mitocondrias. De hecho, se ha observado un aumento del 60 al 70% en la concentración de mioglobina del músculo esquelético, músculo cardíaco y del diafragma en el perro, el hombre, la rata de laboratorio, el hamster Cavia porcellus y otros roedores después de la aclimatación a grandes alturas (Hill, 1976). También se ha interpretado como una respuesta adaptativa el aumento en citocromo oxidasa que se ha observado en varios tejidos de ratones y ratas aclimatados a hipoxia hipobárica. En el caso de otras enzimas oxidativas, los resultados son confusos. Así, según Shertzer y Cascarano (1972) la hipoxia hipobárica (0,5 atm), aumenta los niveles de citocromos en rata. Kinnula (1976) sin embargo, trabajando a presiones menores (0,38 atm) obtuvo el resultado contrario también en rata. Esto hace pensar que el nivel de hipoxia condiciona la posibilidad de esta respuesta. También se han descrito aumentos en la actividad succinato deshidrogenasa (SDH) en varios mamíferos aclimatados a hipoxia hipobárica natural (Hill, 1976).

Los cambios cualitativos son poco frecuentes en los vertebrados como respuesta a la hipoxia y la mayoría de las adaptaciones se realizan a base de la regulación de las vías metabó

licas. Esta regulación se puede llevar a cabo por variaciones en las cantidades de las enzimas celulares (cambios lentos pero más versátiles ya que se pueden alterar las cantidades de los distintos tipos de enzimas) y mediante la regulación de las actividades enzimáticas (cambios rápidos, más finos, pero menos versátiles). La regulación de la cantidad de enzimas se realiza regulando la transcripción, la traducción, la formación de las estructuras 3a. y 4a. y la tasa de degradación. En el caso de la regulación de las actividades enzimáticas estamos en un caso de modulación. Ambos sistemas son importantes en las adaptaciones bioquímicas a la hipoxia. Un ejemplo del segundo tipo es la aceleración de la glucolisis o efecto Pasteur en condiciones de pobreza en oxígeno, que se da en muchos vertebrados, entre los que se encuentran las larvas de Rana (Cohen 1954; Lennerstrand, 1963). En este efecto la regulación de la glucolisis se lleva a cabo mediante la modulación de la enzima reguladora fosfo-fructo-quinasa PFK.

Para que un metabolismo anaerobio se pueda llevar a cabo debe resolver al menos cinco problemas fundamentales: almacenamiento del substrato inicial, regulación del potencial de óxido-reducción, obtención de la suficiente cantidad de ATP, producción de los intermediarios mínimos que acoplen el anabolismo y el catabolismo y la eliminación de los productos finales. Los distintos organismos que poseen una cierta capacidad anaerobia han atajado este problema de distintas maneras.

a.- Invertebrados.

En el caso de los invertebrados hay muchas variedades de metabolismo anaerobio. En algunos, el potencial redox se mantiene como en la mayoría de los vertebrados, gracias a la LDH (lactato deshidrogenasa) pero en otros muchos existen otras enzimas alternativas que mantienen constante la tasa NAD^+/NADH . La razón principal para la existencia de vías metabólicas alternativas es la necesidad de poder sintetizar mayor número de intermediarios acopladores entre el anabolismo y el catabolismo, ya que la glucólisis de los vertebrados sólo suministra cuatro de estos intermediarios: triosa-P, hexosa-P, fosfoenolpiruvato (PEP) y piruvato. Mediante otras rutas metabólicas que existen en estos organismos se pueden también obtener tetrosa-P, pentosa-P, Acetil-coA, 2-cetoglutarato, succinil-coA y oxalacetato según los casos. Además, se logra un rendimiento energético mayor. Estas necesidades corresponden a tiempos mayores de anaerobiosis que deben soportar estos organismos (Hochachka, 1980). Así, en los helmintos parásitos, a partir de glucosa o aminoácidos se extrae ATP anaeróbicamente con formación de succinato, propionato, acetato, lactato (Barrett y Beis, 1973) o ácidos grasos volátiles (Lahoud, 1971) y fijación de CO_2 (Bryant, 1975). La MDH (malato deshidrogenasa) mantiene el balance redox al transformar el oxalacetato en malato. En los moluscos bivalvos se acumulan sobre todo como productos anaerobios finales el succinato y la alanina (Gabbott,

1976). También se forman propionato, acetato, lactato o alanopina. La alanopina se formaría por condensación reductiva del piruvato con la alanina, reoxidando el NADH a NAD^+ (Hochachka, 1980). En los moluscos cefalópodos se forma sobre todo octopina como producto final por condensación de piruvato y arginina. Esta reacción suple a la de la LDH con la presencia de la enzima que la realiza, la octopin deshidrogenasa, ODH (Gäde y Grieshaber, 1975). Se ha descrito recientemente la presencia de ODH en Nautilus pompilius y en gasterópodos (Baldwin, 1980). En los anélidos se obtiene energía anaerobia también con la formación de succinato, acetato, propionato o ácidos grasos volátiles y con fijación de CO_2 (Coles, 1970; Schöttler y Wienhausen, 1981). Todas estas vías presentan además la ventaja de acumular productos finales con una fuerza ácida menor que la de el lactato y en algunos casos, como en la formación de succinato o propionato, el rendimiento energético es mayor y se obtiene un mayor número de intermediarios metabólicos que en el caso de la reacción de la LDH como último paso de la vía metabólica.

b.- Peces.

En los peces, como en el resto de los vertebrados, el metabolismo anaerobio principal se basa en la glucólisis anaerobia, en la que se obtiene energía a partir de la glucosa o el glucógeno, con formación de lactato como producto final. El flujo de carbono a través de esta vía metabólica está controlado

por las enzimas reguladoras glucógeno fosforilasa, hexoquinasa, fosfofructoquinasa (PFK) y piruvato quinasa (PK). La glucógeno fosforilasa es sensible a varias hormonas, el AMP y el ión Ca^{++} y además está integrada su acción con la de la fosfatasa sintetasa. La PFK por otra parte, se activa cuando los niveles de AMP, ADP, fructosa-6-fosfato, y fructosa-1,6-difosfato son altos y se inhibe si sube la concentración de ATP, citrato o creatin-fosfato. El descenso de pH producido por la acumulación de lactato activa también la PK. En los poiquilothermos además, el aumento en la concentración de fructosa-1,6-difosfato activa la PK con lo que se coordina esta última enzima con la PFK (Hochachka, 1980). Todos estos mecanismos reguladores permiten la obtención de energía en situaciones anaerobias. La producción de ATP es así de 2 moles por cada mol de glucosa consumido y el equilibrio redox se mantiene por acoplamiento entre la reacción de la LDH y la de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GA-3PDH). La LDH tiene también una importancia grande en el metabolismo glucolítico anaerobio debido a sus isoenzimas, como veremos más adelante. Estas isoenzimas, son una de las soluciones a la acumulación de lactato como producto final. Otras soluciones para contrarrestar el descenso del pH provocado por la acumulación de lactato son: la presencia de una capacidad de tamponamiento más alta en los organismos aclimatados a la hipoxia y la metabolización del lactato en otros tejidos (Hochachka y Somero, 1973).

Sin embargo, ya hace tiempo que se sabe que en muchas especies de peces aparecen otros productos finales como el CO_2 durante la anoxia (Blazka, 1958; Kutty, 1968). También se forman en ocasiones succinato y alanina como productos finales anaerobios, como resultado de la cooperación entre el metabolismo glucolítico y el de aminoácidos. Así, se ha detectado acumulación de succinato en la aclimatación a la hipoxia en el músculo rojo pero no en el blanco de Carassius carassius (Johnston, 1975), en el músculo rojo de Cyprinus carpio pero no en el de Salmo Gairdneri (Smith y Heath, 1980) o en la sangre de Torpedo marmorata (Hughes y Johnston, 1977). En Platichthys flesus, además de acumularse lactato en hipoxia en todos los órganos, se acumula succinato en el hígado y alanina en el músculo, el corazón y el hígado (Jørgensen y Mustafá, 1980). En muchos casos la literatura es aparentemente contradictoria pero esto se debe a las diferencias en los tiempos de exposición a la hipoxia y a los niveles de la misma. Se ha sugerido (Johnston, 1974, 1975) que el músculo rojo sería el más adaptado a la utilización de vías anaerobias no convencionales, ya que está más constantemente activo, pero se ha descrito también acumulación de alanina en el músculo blanco (Driedzic y Hochachka, 1976). Hochachka (1980) ha propuesto un modelo anaerobio para Carassius auratus basado en la cooperación metabólica entre órganos. Según este modelo, los órganos que siguen manteniendo su nivel de actividad en ausencia de oxígeno, obtienen energía por la vía clásica de formación de lactato. Este lactato, a través del torrente circulatorio, pasaría a metabolizarse en otros tejidos. En

el hígado daría por una parte lípidos y por otra, amoníaco, acetato y CO_2 que se eliminarían al medio externo. En el corazón y el músculo rojo, además de lípidos y CO_2 , se formaría etanol a partir de lactato a través de acetil-CoA, acetato y acetaldehído, reoxidándose dos moléculas más de NADH (Shoubridge y Hochachka, 1979). De todas formas, la formación de lactato por la glucólisis convencional sigue siendo una de las vías principales de obtención de energía anaerobia en los peces. Así, el músculo blanco del atún que es extraordinariamente activo en la natación rápida, presenta la actividad LDH más alta que se conoce en la naturaleza, 6.000 μ moles de NADH oxidados/gr./minuto a 25°C y llega a acumular lactato hasta una concentración de 100 μ moles/gr. de peso húmedo (Guppy y Hochachka, 1979).

c.- Anfibios

El caso de los anfibios presenta más variedad desde el punto de vista respiratorio que el de los peces, pero el papel de las vías metabólicas es sin embargo, mucho más uniforme. No se ha descrito hasta la actualidad en el caso de los anfibios, la existencia de vías metabólicas alternativas a la formación de lactato, durante la hipoxia, la anoxia o el ejercicio. Ya desde hace mucho tiempo (Aubert, 1881 y Bohr 1900), se ha sugerido que los anfibios podrían realizar una anaerobiosis sostenida. Esta capacidad no es ilimitada, pero a bajas temperaturas se alcanzan tiempos de anaerobiosis total, superiores a los cin-

co días en Rana pipiens (Christiansen y Penney, 1973). La exposición de los anfibios a la anoxia total suele producir descensos del glucógeno hepático (Armentrout y Rose, 1971) y del glucógeno cardíaco (Rose et al., 1971; Christiansen y Penney, 1973) extremadamente agudos. Estos descensos coinciden con aumentos del lactato y la glucosa en sangre. El trabajo de Rose y Drotman (1967) mostró que en Rana pipiens la supervivencia en anoxia estaba disminuía en los individuos que habían sido tratados previamente con iodoacetato, un inhibidor de la glucólisis. En condiciones de hipoxia, el resultado final es el mismo que en anoxia: obtención de energía anaerobia con acumulación de ácido láctico (Emilio, 1974; Boutilier y Toews, 1977 y D'Eon et al., 1978). Además, en condiciones anaerobias se da también en los anfibios el efecto Pasteur tanto en larvas (Cohen, 1954; Lennerstrand, 1963) como en adultos (Yorio et al., 1979). El problema de la acumulación de lactato en la hipoxia prolongada se resuelve en los anfibios de distintas maneras. Según Simkiss (1968) la acidosis debida al lactato se tamponaría con ayuda del carbonato cálcico de los sacos endolinfáticos del oído interno, y de la columna vertebral. En Rana pipiens, sin embargo, como muestra el trabajo de Christiansen y Penney (1973), al cabo de cinco días a 5°C, los niveles de ácido láctico en sangre y linfa se multiplican por 33 y 56 respectivamente, mientras que en el resto del cuerpo el incremento es del orden de cuatro veces y la liberación de lactato al agua circundante no llega al 5%. Este autor supone que la linfa es el lugar más importante donde se deposita el lactato durante la anoxia

prolongada. En el caso de la actividad forzada el efecto varía según las especies. En especies de movimientos lentos pero constantes como Bufo, la anaerobiosis representa sólo el 28% del _ gasto energético total durante la actividad forzada (Seymour, 1973), mientras que en Taricha torosa representa el 65,2% (Harlow, 1978) y en Batrachoseps el 98% (Bennett y Licht, 1973). En cualquier caso, se ha demostrado que en los períodos cortos de actividad muy alta como en el caso de la huída, la anaerobiosis es la fuente principal de energía (Bennett y Licht, 1973; Putnam, 1979) en el caso de los anfibios.

2.- Efecto de la hiperoxia.

El oxígeno molecular es por supuesto esencial para la vida de organismos aerobios como los vertebrados, pero ya desde hace mucho tiempo se sabe que resulta ser tóxico cuando se suministra a concentraciones sólo ligeramente superiores a las normales (Lavoisier, 1783). Esta toxicidad se ha observado tanto _ en los organismos animales como en cultivos celulares y en orgánulos aislados. En el caso de los animales con respiración _ aérea, el primer órgano en ser afectado suele ser el pulmón, _ produciéndose edema, efusión pleural, hemorragia, atelactasia y en casos extremos se llega a la muerte a través de una anoxia hiperóxica. El daño causado afecta a continuación a otros órganos y depende del tiempo de exposición, de la tensión de oxígeno y de si la hiperoxia es hiperbárica o normobárica. _ Así, el tiempo letal 50 a una atmósfera de oxígeno puro es de

tres días para la rata, 5,5 para el ratón, 9,5 para el pollo y 14 para la codorniz, mientras que la aplicación de 3 atmósferas de oxígeno puro provoca la muerte a las pocas horas. En peces, la resistencia a estas tensiones de oxígeno altas desciende además al aumentar la temperatura y a pHs extremos. En Rana hay resistencia a 1 atmósfera de oxígeno durante 40 días y sobreviven 65 horas a 3,5 atmósferas: Ambystoma mexicanum presenta convulsiones en presencia de oxígeno a 7,5 atmósferas al cabo de 15 horas. En embriones de Rana se ha observado también envenenamiento por oxígeno. (Wiebe y McGavock, 1932; Malamed, 1958; Viono, 1960; Benet y Bochet, 1963; Fridovich, 1975; Packer y Fuehr, 1977; Halliwell, 1978 a).

Uno de los efectos de la hiperoxia más comunmente observados al microscopio electrónico se refiere a las mitocondrias. Se ha encontrado en rata y ratón un aumento del tamaño y aberraciones de las crestas mitocondriales como consecuencia de la exposición a la hiperoxia. Estos cambios aparecen ya a los 3 días de exposición a una atmósfera de oxígeno y a veces se alteran también las membranas celulares. Las mitocondrias alteradas solían sufrir fagocitosis (Ludwin et al. 1974; Douglas 1974). Se han estudiado también los efectos de la hiperoxia sobre los niveles de enzimas y coenzimas celulares. Así, la aplicación de oxígeno a 1,8 atmósferas durante 4 ó 18 horas provoca un descenso de la actividad LDH en el hígado, riñón y pulmón del ratón (Delarbre et al., 1976), mientras que la aclimatación a 304 mm Hg de oxígeno no alte-

ra la actividad de esta enzima ni de la tasa NAD^+/NADH en el pulmón de esta misma especie (Kaplanskii et al., 1973). Se ha descrito sin embargo, un aumento de la relación $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ en el cortex del ratón con la exposición a 6 atmósferas de oxígeno puro durante 8 ó 16 minutos (Darol y Faiman, 1978).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la acción tóxica del oxígeno sobre los organismos. Una de las primeras que se propusieron fue la suposición de que el oxígeno inactivaba las enzimas, especialmente las deshidrogenasas, debido a la oxidación de los grupos -SH (Haugaard, 1968). Un mecanismo defensivo presente en las células aerobias contra este efecto del oxígeno, es la presencia de concentraciones altas de glutatión, cisteína o cisteamina (Butler et al., 1979). De todas formas, la oxidación de los grupos -SH por el oxígeno es muy lenta si no están presentes trazas de iones metálicos (Kiesow, 1977). El oxígeno puede ser también tóxico debido a la formación de peróxido de hidrógeno. Esto ocurre en las células cuando el oxígeno toma dos electrones en reacciones catalizadas por varias oxidasas celulares. De todas formas, el peróxido de hidrógeno suele estar en concentraciones bajas, debido a su descomposición por la enzima glutatión peroxidasa (GP) (Cohen y Hochstein, 1963). En condiciones de hiperoxia sin embargo, parece ser que la enzima encargada de esta función es sobre todo la catalasa (CAT) (Crapo et al, 1978; Frank et al., 1979).

Quizás uno de los radicales más activos que se forman como consecuencia de la hiperoxia sea el radical superóxido, O_2^- . La adición de un electrón al oxígeno molecular, catalizada por enzimas como la aldehído oxidasa, la peroxidasa o la xantina oxidasa, provoca la aparición del radical superóxido (Forti, 1977). También se forman radicales superóxido in vivo durante la autooxidación de algunos compuestos reducidos, como la adrenalina, las flavinas, o algunos componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Nohl y Hegner, 1978). La reacción del radical superóxido con el peróxido de hidrógeno, provoca además la formación de radical hidroxilo y oxígeno activado por la ecuación de Haber-Weiss (Fridovich, 1976). Estos componentes, radical superóxido, radical hidroxilo y oxígeno activado provocan principalmente inactivación de las enzimas con grupos -SH, roturas en el DNA y peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas de los orgánoides celulares (Frank y Massaro, 1980). La peroxidación de los lípidos da entre otras sustancias, aldehídos y especialmente malonaldehído, como productos finales y es además una reacción en cadena iniciada por radicales hidroxilo. Esta peroxidación daña las membranas celulares (Tappel, 1973; Frank y Massaro, 1980). Se ha demostrado que en condiciones de hiperoxia esta peroxidación de lípidos está muy aumentada (Dulka y Risby, 1976). Frente a esto, las células animales poseen sistemas protectivos, como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GP) o catalasa (CAT). La enzima SOD, mediante la reacción

$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$, elimina el radical superóxido, con lo que se evita la formación de radical hidroxilo en la reacción de Haber-Weiss y por tanto la peroxidación de los lípidos (McCord et al., 1971; Halliwell, 1978 b). El papel protector de la SOD contra la toxicidad del oxígeno parece verse reforzado por experimentos recientes, ya que la enzima parece mostrar actividad más alta en los órganos más aerobios, como el corazón y el cerebro, que en los más anaerobios como el músculo esquelético (Balgoo y Roberts, 1979). Se ha demostrado además un aumento notable de la SOD pulmonar en varios mamíferos expuestos a hiperoxia y una correlación positiva entre este aumento y la resistencia a la hiperoxia (Crapo y Tierney, 1974; Frank et al., 1977; Frank et al., 1978; Yam et al., 1978; Frank et al., 1979). Sin embargo, la administración de SOD en ratas no ha podido demostrar un aumento de la tolerancia al oxígeno, aunque esto puede quizás deberse a que la enzima no atraviese las membranas celulares (Halliwell, 1979). Estudios en realización en nuestro laboratorio parecen también apoyar el papel adaptativo de la SOD como respuesta a la hiperoxia en el caso de los anfibios.

Otra enzima que detiene también la peroxidación de los lípidos es la glutatión peroxidasa (GP), reduciendo los peróxidos de lípido a productos no tóxicos (Chow, 1976). Los equivalentes de reducción proceden de glutatión reducido que pasa a glutatión oxidado. A su vez; la glutatión reductasa vuelve a reducir el glutatión a partir de NADPH. El NADPH se regenera

entonces con la actuación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Frank y Massaro,1980). Otra enzima que está implicada en el mecanismo protector de los lípidos ante los agentes oxidantes es la vitamina E que funcionaría donando hidrógeno a los peróxidos de lípido, impidiendo así su reacción con ácidos grasos vecinos (Horwitt,1976;Mustafá y Tierney,1978). Se ha sugerido que la vitamina C podría tener también un papel antioxidante pero la literatura no es clara y hay autores que sugieren incluso un papel contrario para esta vitamina, que sería entonces un promotor y no un protector de la peroxidación de los lípidos (Allen y Hall,1973;Demopoulos,1973;Mustafá y Tierney,1978).

II.- EL METABOLISMO CELULAR DURANTE EL DESARROLLO DE LOS ANFIBIOS.

1.- Desarrollo embrionario.

El oocito maduro de los anfibios es una célula de gran tamaño, que alcanza normalmente 1 mm de diámetro. La mayor parte del citoplasma alberga substancia de reserva, la vitelogenina, formada por lípidos y fosfoproteínas, que se sintetiza en el hígado de la madre y llega a los oocitos a través del torrente circulatorio. Se ha estimado en X.laevis que cerca del 99% de las proteínas vitelinas derivan de la vitelogenina hepática materna (Wallace et al.,1980). El porcentaje de principios inmediatos fundamentales ha sido estudiado en huevos maduros de Rana, Bufo y Ambystoma, encontrándose que los hi-

dratos de carbono suponen un 3-8% del peso seco, los lípidos entre el 10 y el 35% y las proteínas entre el 30 y el 46% (Ward,1962;Takamoto,1968 y Salthe y Mecham,1974). Existe también una gran acumulación de DNA y RNA citoplásmicos además del nuclear. La cantidad de DNA citoplásmico supone la equivalente a varios miles de núcleos diploides (0,96 µg en el huevo fecundado de Rana pipiens; Sze,1953) y se supone que al menos en parte proviene de la rotura de los núcleos de las células foliculares (Deuchar,1975). Esta enorme cantidad de DNA parece estar relacionada con la ausencia de síntesis del mismo hasta la gastrulación. Hay también acumulación de RNA-m que se sintetiza en los lazos de los cromosomas plumosos durante la primera división meiótica (Callan,1952;Crampton y Woodland,1979) y una gran acumulación de RNA -r relacionada con la presencia de un gran número de nucleolos. Este RNA-r supone una reserva de ribosomas hasta que se vuelvan a sintetizar de nuevo en el período de gástrula.

.....

Respecto a la distribución de metabolitos en el oocito, en 1971 describieron Brachet y Malpoix la presencia de varios elementos citoplásmicos entre los que estaba el glucógeno, alrededor de la vesícula germinativa. Ya en 1933 describía Wintrebert, por primera vez, la presencia de una región citoplásmica libre de vitelo alrededor del núcleo de la célula huevo de Discoglossus pictus. Recientemente, Klag y Ubbels (1975), han confirmado este hecho en esta misma especie con más detalle, gracias al desarrollo de técnicas de fijación

más adecuadas. Según este autor, en Discoglossus pictus aparece una zona de citoplasma claro rica en glucógeno alrededor del núcleo. Este citoplasma claro se desplaza luego a la futura zona dorsal donde se formará el blastoporo. Una disposición yuxtannuclear del glucógeno se ha observado también con la técnica de la metacromasia en el cigoto de rata (Izquierdo, 1955) y en varios roedores en el estado de mórula (Dalcq, 1952).

El tipo de metabolismo varía según los estados del desarrollo. Así, en Ambystoma mexicanum, el embrión utiliza hidratos de carbono en los primeros estados, especialmente en la gastrulación. Después comienza a utilizar grasas, dejando el metabolismo proteico para las etapas finales del desarrollo larvario (Løvtrup, 1959). En Rana se han encontrado resultados similares (Boell, 1948; Urbani, 1962). En cualquier caso, ya hace tiempo que está establecido que los embriones de anfibios poseen todos los substratos, enzimas y cofactores necesarios para realizar la glucolisis anaerobia por la ruta clásica de Embden-Meyerhof-Parnas (Brown, 1964; Brachet, 1975).

Ya desde hace mucho tiempo se ha observado que la gástrula de los anfibios y especialmente la región del labio dorsal del blastoporo, tienen un metabolismo glucolítico muy alto (Woerdeman, 1933a). La observación del mismo fenómeno en la inducción del cristalino por la copa óptica (Woerdeman, 1933b) y en la línea primitiva del embrión de aves (Jacobsen,

1938), llevó a la relación entre el metabolismo glucolítico y el fenómeno de la inducción. Investigaciones posteriores desecharon esta idea (Waddington et al., 1936; Heatley y Lindhal, 1937 y Jaeger, 1945) y se empezó a relacionar la alta velocidad de desaparición de glucógeno con los movimientos de la gastrulación. Otro indicio del aumento del metabolismo glucolítico en la gástrula de anfibios se ha obtenido por las medidas del cociente respiratorio, que va desde 0,69 en el cigoto y la segmentación, hasta 1,0 en la gástrula (Brachet, 1934). Se ha objetado, sin embargo, que el metabolismo oxidativo de aminoácidos a amoníaco daría también un cociente respiratorio semejante a 1,0 (Needham, 1932). Esta objeción se soslaya por el hecho de que las proteínas no son utilizadas como fuente de energía hasta estados posteriores (Gregg y Ballentine, 1946; Lovtrup, 1959). Parece que efectivamente durante los primeros estados del desarrollo, la fuente energética principal del embrión de anfibio son los hidratos de carbono, glucógeno en un 90% (Gregg, 1948), pero que no todo el glucógeno se degrada a lactato o a $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, sino que parte de él pasa a pentosas que serían necesarias para la formación de nucleótidos (Hoff-Jorgensen y Zeuthen, 1952). Waldvogel (1965) en Xenopus laevis y Boulekbache y Barja de Quiroga (1981) en Pleurodiles waltlii han encontrado también pruebas de la existencia de una glucolisis anaerobia elevada en la región del labio dorsal del blastoporo. Otro enfoque al problema se ha tratado midiendo los niveles de actividad de la deshidrogenasa láctica (LDH) durante el desarrollo.

Así, se ha encontrado un máximo de actividad LDH en la gástrula y la néurula de Salmo irideus (Boulekbache et al., 1969), de Xenopus laevis, Ambystoma mexicanum y Triturus alpestris (Faulhaber y Lyra, 1975).

Por otra parte, se ha mostrado en Salmo irideus (Boulekbache et al., 1971), que el oxamato, inhibidor competitivo de la LDH, detiene el desarrollo en el estado de gástrula y lo hace más lento en el estado de neurula. Løvtrup (1978), ha mostrado, sin embargo, que el lactato 10mM inhibe la gastrulación pero se sabe que en condiciones fisiológicas no se alcanzan concentraciones superiores a 0,5mM (Gregg, 1962), por lo que la utilización de la glucólisis anaerobia no puede suponer un peligro para el desarrollo debido a la acumulación de lactato. De hecho, la formación de lactato a partir de glucógeno se ha comprobado repetidas veces en gástrulas de Rana y Bufo tanto en condiciones anaerobias (Brachet 1934; Barth y Barth, 1954; Cohen, 1954; Barbieri y Salomón, 1963) como aerobias (Brachet, 1934; Gregg et al., 1964). Esta formación de lactato es mayor en hipoxia, como ocurre en condiciones naturales cuando los huevos se disponen en grupos muy compactos (Barth y Barth, 1954).

2.- Desarrollo larvario.

Es corriente que el consumo de oxígeno suba progresivamente durante el desarrollo de las larvas de anfibios como con-

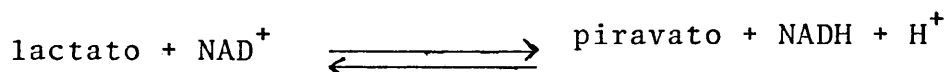
secuencia del crecimiento. Sin embargo, en ocasiones, como es el caso de Ambystoma, el $\dot{V}O_2$ se mantiene constante durante el período larvario, si se expresa por unidad de peso (Weigmann y Altig, 1975). En Discoglossus pictus hay un aumento constante del $\dot{V}O_2$ durante la pre y prometamorfosis, y durante el climax metamórfico se produce un descenso (Peris, 1977). En un principio se había pensado en la existencia de un efecto calorigénico como el de los mamíferos en el clímax metamórfico de los anfibios, ya que durante esta fase aumentan mucho los niveles de tiroxina circulante. Sin embargo, como ocurre en Discoglossus pictus, se ha encontrado un descenso del $\dot{V}O_2$ durante el clímax metamórfico en Xenopus laevis, Rana temporaria, Bufo vulgaris y Rana catesteiana (Etkin, 1934; Fletcher y Myant, 1959; Funkhouser y Mills, 1969). De hecho, no se han descrito aumentos importantes del consumo de oxígeno hasta la actualidad, en esta fase del desarrollo.

La vida larvaria suele ser un período de acumulación de glucógeno, el cual se almacena en el hígado y el músculo, y después se consume de una forma muy acelerada en el clímax metamórfico. Esto se ha descrito en gran número de especies, como Alytes obstetricans (Beaumont, 1960), Xenopus laevis (Hanke y Leist, 1971) o Rana pipiens (Farrar, 1973). El desencadenamiento de esta glucólisis tan acelerada durante el clímax metamórfico parece ser el resultado conjunto de la acción de los glucocorticoides adrenales, la insulina y la tiroxina.

III.- LACTATO DESHIDROGENASA

1.- Propiedades generales.

La enzima lactato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27, LDH) cata
liza la interconversión del lactato y el piruvato:



en esta reacción se produce también una óxido-reducción del sistema $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$. Esta enzima juega un papel muy importante en las rutas metabólicas especialmente en el metabolismo de los hidratos de carbono. En la glucólisis anaerobia, es la enzima terminal de la serie de reacciones que van desde la glucosa al lactato. Está implicada también en la gluconeogénesis a partir de lactato y en tejidos aerobios como el corazón, el lactato sirve de combustible para cebar el ciclo Krebs.

a.- Especificidad D-L.

La LDH de los vertebrados es siempre tetramérica, con un peso molecular aproximado de 140.000 y específica para el L-lactato. Sin embargo, en muchos invertebrados, como los moluscos, artrópodos, anélidos o celentéreos, se han encontrado LDHs específicas para D-lactato (Long y Kaplan, 1968). En un

principio, se estableció una asociación entre la especificidad-D y una estructura dimérica (Long,1976), pero recientemente se han descrito LDHs tetraméricas D-específicas en Helix aspersa (Storey,1977) y en Balanus nubilus (Ellington, 1978). Por otra parte, se ha descrito también la existencia de LDHs diméricas, L-específicas (Gerd,1979). En cualquier caso, tanto en las tetraméricas como en las diméricas, el peso molecular aproximado por subunidad es del orden de 34 a 36.000 daltons.

b.- Isoenzimas.

El concepto de la existencia de formas múltiples o isoenzimas en la LDH fue introducido por primera vez por Markert y Møller (1959). La base para la existencia de estas isoenzimas es la presencia de dos tipos de subunidades, M (ó A) y H (ó B), codificadas por dos loci génicos distintos no ligados. Estas dos subunidades básicas presentan diferencias en su estructura química, y en sus propiedades cinéticas e inmunológicas, y su recombinación en tetrámeros produce los patrones de cinco isoenzimas comunmente observados en los vertebrados: LDH 1 (H_4), LDH 2 (H_3M), LDH₃ (H_2M_2), LDH₄ (HM_3) y LDH₅ (M_4). Sin embargo, en algunos tejidos y órganos de ciertas especies se han encontrado otras subunidades LDH distintas, codificadas por otros loci génicos. Aparece así una LDH-X (C_4) en los testículos de los espermatozoides de aves y mamíferos (Blanco y Zinkhan,1963;

Zinkham,1969). Esta LDH-X no se presenta nunca en ningún otro tejido del macho y en ninguno de la hembra y presenta varias similitudes estructurales con la LDH-1 y la LDH-5. Se ha sugerido que sus propiedades bioquímicas estarían correlacionadas con las necesidades del metabolismo testicular, aunque sigue sin esclarecerse la necesidad en este caso de un nuevo tipo de isoenzima espermática. Sus subunidades C pueden formar híbridos activos con las subunidades H y M (Wheat y Goldberg, 1975). Las células del tejido nervioso de los teleósteos, especialmente las fotorreceptoras, presentan la subunidad E, que tiene una velocidad electroforética superior a la de la H (Whitt,1970). Esta isoenzima ha sido descrita como LDH-C₄ por Shaklee et al. (1973). Se ha descrito también una LDH-F específica del tejido hepático en los peces gadoideos (Sensabaugh y Kaplan,1972). Todas estas subunidades H,M,C y E (ó C) están codificadas por loci génicos independientes. Las isoenzimas LDH F y LDH-C₄ (ó E) parecen estar compuestas por la misma subunidad, C (Markert et al.,1975).

c.- Estructura y composición de aminoácidos.

La composición de aminoácidos de la LDH se ha identificado en especies como el pollo, la vaca y el cerdo para la subunidad H y en estas mismas especies y en el pez-perro Scyliorhinus canicula para la subunidad M (Wachsmuth et al., 1964; Pesce et al.,1967; Taylor et al.,1973). La LDH-X ha sido estudiada en el ratón (Goldberg,1972). En general, las subunidades

M presentan una riqueza mayor en los aminoácidos básicos lisina, histidina y arginina y un menor número de residuos ácidos aspártico y glutámico que las subunidades H, como sería de esperar al tener este último tipo de subunidad una mayor velocidad de migración hacia el ánodo que la subunidad M. La subunidad C presenta una similitud mayor con la subunidad H que con la M.

d.- Secuencia de aminoácidos.

En Squalus acanthias se ha llegado a secuenciar cerca del 80% de la subunidad M (Taylor et al.,1973) . La molécula presenta 329 aminoácidos y tiene dos partes unidas por tres cadenas conectivas. Cerca del 20% de la molécula presenta hélice α . La subunidad es globular. Recientemente se ha secuenciado la subunidad C del ratón por análisis de difracción de rayos X, obteniéndose también un número de 329 resíduos (Musick y Rossmann,1979).

e.- Propiedades cinéticas.

Los datos referentes a las medidas de la K_M aparente presentan una gran variabilidad en las distintas especies. Sin embargo, en todas las especies se coincide en encontrar: una afinidad mayor por el piruvato que por el lactato; una afinidad mayor en la LDH 1 que en la LDH 5 tanto por el piruvato como por el lactato; que la diferencia de afinidad por el pi-

ruvato entre la LDH 1 y la LDH 5 no suele llegar a ser de un orden de magnitud. La cinética de la LDH se ve también muy afectada por la temperatura de aclimatación, y por el pH de medida (Yamawaki y Tsukuda, 1979; de Costa et al., 1979; Daka y Laidler, 1980). Mientras que en los mamíferos se han descrito pH óptimos para el piruvato cercanos a 8,0, en los anfibios parece encontrarse un valor más próximo a 7,0 (Faulhaber y Lyra, 1975).

f.- Inhibidores.

Desde hace tiempo se sabe que concentraciones altas de sustrato (lactato o piruvato) inhiben todos los tipos de LDH. Además, las isoenzimas que contienen subunidades H son más sensibles a la inhibición por exceso de sustrato que las que están formadas por subunidades M. Se ha sugerido que la inhibición por sustrato se debería a la formación de dos tipos de complejos ternarios inactivos, compuestos por la enzima el sustrato y el cofactor (NAD^+ ó NADH), (Fromm, 1961; Stambaugh y Post, 1966). No se sabe, sin embargo, si estos complejos ternarios tienen un papel fisiológico in vivo.

Existen también otros inhibidores que son análogos a los verdaderos sustratos. Así, el oxamato es un inhibidor competitivo de la LDH cuando el piruvato es el sustrato y el oxalato es un inhibidor competitivo respecto al lactato (Novoa et al., 1959; Hochachka, 1975). Cuando el sustrato es el lactato, en

cambio, la inhibición por oxamato no es competitiva, y es más acusada sobre la LDH 1 que sobre la LDH 5 (Wilkinson y Walter, 1972). Por otra parte, el oxamato ha mostrado ser un inhibidor de la glucolisis sin afectar el metabolismo aerobio, en algunos sistemas celulares estudiados in vitro (Papa-constantinou y Colowick, 1961). Se ha observado que el oxamato es un inhibidor competitivo en las LDHs L-específicas (Gäde, 1979), pero no en las D-específicas (Ellington y Long, 1978). Recientemente, se ha descrito que el deoxicolato sódico es un inhibidor selectivo de la LDH de rata, ya que llega a inactivar totalmente la LDH 5 sin afectar a la LDH 1 (Lehnert y Berlet, 1979). Existen otras sustancias que contienen sulfuro, cianuro, hidroxilamina o sulfitos y que forman complejos con la enzima y el NAD^+ , compitiendo con el lactato.

2.- La LDH y el polimorfismo bioquímico.

Como se ha descrito en el apartado anterior, se han citado hasta cuatro tipos de subunidades de la LDH (H, M, C, E o C) que están sintetizadas por loci génicos diferentes. En este apartado nos referiremos a las variaciones respecto al patrón típico de cinco isoenzimas de la LDH, originadas por la existencia de variantes alélicas en los genes que sintetizan esas subunidades, o por modificaciones epigenéticas.

a.- Peces.

De entre los peces el caso más notable es el de los salmónidos, que presentan en ocasiones patrones electroforéticos de 15 o más bandas LDH (Goldberg,1966; Ohno et al., 1968; Massaro y Markert,1968; Holmes y Markert,1969; Wuntch y Goldberg, 1970; Markert et al.,1975). Estudios genéticos posteriores han mostrado que la LDH de Salmo Gairdneri está controlada por cinco loci génicos (Morrison y Wright,1966; Morrison,1970; Allendorf,1973). Ohno et al. (1968) y Klose et al. (1968) han puesto de manifiesto además que los salmónidos son tetraploides. Así los patrones electroforéticos en estos peces surgirían de la presencia de genes situados en loci distintos, que sintetizarían las subunidades H y H', M y M' y la subunidad C de la retina. Los polipéptidos H' y M' habrían surgido por duplicación y posterior divergencia de los polipéptidos H y M (Markert,1975;Lim y Bailey,1977). Se ha descrito también la existencia de polimorfismos en las subunidades H y H' (Uter y Hodgins,1972) y en la subunidad M (Allendorf et al.,1976) de Salmo gairdnerii y Salmo trutta, debidos a la existencia de variantes alélicas en la subunidad M de Salmo clarki (Klar y Stalnaker,1979). El orden de los gadiformes ha mostrado también la presencia de dos o incluso tres mutantes alélicos en la subunidad M (Lush,1970; Odense y Leung,1975) y en la subunidad H (Markert y Faulhaber,1965; Odense et al.,1969; Utter y Hodgins,1969; Odense y Leung,1975). Se han descrito variantes alélicas en los genes LDH en otras especies de peces como

ocurre en las subunidades H de Fundulus heteroclitus (Place y Powers, 1978) o en las subunidades M de Pimephales promelas (Merritt, 1972) y de Anoplarchus purpurescens (Johnson, 1971; Sassaman y Yoshiyama, 1979). También la subunidad C (ó E) presenta variantes debido a mutaciones ocurridas en un mismo locus (Sensabaugh y Kaplan, 1972).

b.- Anfibios.

El número de isoenzimas LDH que se ha descrito en las distintas especies de anfibios es muy variable desde 2 a 25 (Wright, 1964; Adams y Finnegan, 1965; Wright y Moyer, 1966 y 1968; Balek et al., 1967; Moyer et al., 1968). El patrón clásico de cinco bandas parece ser la excepción más que la regla, aunque se ha encontrado en algunas especies de ceratophrydidos (Schwantes et al., 1969), en el género Hyla (Maxon y Wilson, 1974) y en Discoglissus pictus (Alonso y Torrellas, 1973). Se ha demostrado sin embargo, que los anfibios poseen los dos tipos básicos de subunidades, H y M, de forma que los patrones con un número de bandas menor que cinco se deben a una falta de asociación de ambas subunidades, o a la inestabilidad de ciertas combinaciones híbridas. Así, se han descrito patrones LDH con dos bandas en Rana temporaria, tres bandas en Bombina variegata y Triturus alpestris (Chen, 1968) y con dos o cuatro bandas según los órganos en Rana ridibunda (de Costa et al., 1978). En los tritones Taricha granulosa y Taricha rivularis se ha descrito además un caso raro de inversión de cargas, de forma que la subunidad M

es más anódica que la H (Wright y Moyer, 1973).

Se han citado también por diversos autores casos con patrones LDH de más de cinco bandas en los anfibios. En estos casos la causa suele ser la existencia de varios alelos en el mismo locus del gen que sintetiza la subunidad H o la subunidad M. Así, en distintas especies y subespecies del género Xenopus se han descrito patrones con más de cinco bandas (Claycomb y Villee, 1971; Kunz, 1973; Wall y Blacker, 1974; Faulhaber y Lyra, 1975). Mediante experimentos de hibridación, Lyra et al., (1976) concluyeron que estos patrones se debían a la existencia de dos tipos de subunidad M sintetizados por dos alelos situados en el mismo locus, en Xenopus laevis laevis. Un estudio reciente en 13 especies del género Xenopus muestra la existencia de variaciones en las subunidades H y por primera vez en los anfibios la demostración de un patrón de 15 bandas LDH en Xenopus laevis ssp.n. Este patrón se debería a la existencia de dos tipos de subunidades H (Vonwyl y Fischberg, 1980). En el género Rana, todos los patrones LDH con bandas suplementarias estudiados hasta la actualidad se deben a la existencia de varios tipos de subunidades H codificadas por alelos situados en un mismo locus. Así, se han descrito once isoenzimas LDH en Rana pipiens pipiens y Rana pipiens sphenoccephala. Se ha demostrado que las bandas suplementarias provienen de variaciones en las subunidades H, proponiéndose la existencia de tres subunidades: H^a , H^b , y H^c que formarían las bandas del complejo LDH1 en Rana pipiens (Wright y Moyer, 1966, 1968). Sin embargo, esta

variación en las subunidades H debida a la existencia de variantes alélicas no es exclusiva de Rana pipiens, ya que se ha descrito en otras especies del género Rana, como Rana perezi y Rana esculenta (Vogel y Chen, 1976; Graf et al., 1977). No se detectaron variantes alélicas en las subunidades M en estas especies.

Ha habido sin embargo, cuatro referencias de variantes en las subunidades M en otras familias de anuros más primitivas que los ránidos. Así, se han descrito variantes en las isoenzimas LDH compuestas por subunidades M en Hyla regilla (Maxson y Wilson, 1974), en Hyla crucifer (Keller y Lyster, 1977) y en X. laevis (Lyra et al., 1976). En estos tres casos, sin embargo, no se hicieron los estudios genéticos correspondientes. En el trabajo reciente de Szymura y Swies (1979), se ha observado la existencia de un polimorfismo en la LDH 5 de Bombina bombina y Bombina variegata, demostrándose mediante cruzamientos inter-específicos, que este polimorfismo se debe a la existencia de dos alelos en el locus que sintetiza la subunidad M. Se ha descrito también la existencia de subunidades H y H' en Triturus vivides-cens (Sherr, 1968), Triturus alpestris y Triturus helveticus (Faulhaber y Lyra, 1978). En estos casos aparecen seis isoenzimas debido a la falta de hibridación entre las subunidades M y las H y H'. Estas dos últimas subunidades sí hibridan entre sí para formar heteropolímeros. En Ambystoma mexicanum aparecen desde seis a once isoenzimas según los órganos estudiados. Los estudios inmunológicos son poco claros,

pero se ha sugerido la existencia de variación polimórfica en las subunidades M (Faulhaber y Lyra,1978).

c.- Amniotas.

En los réptiles, las aves y los mamíferos, se han descrito también variantes alélicas de los genes que codifican las subunidades H y M en algunas especies. En algunos casos, como ocurre en Somateria mollissima (Blix et. al.,1973) o en el hamster chino (Stamato y Jones,1977), se obtienen patrones LDH con una sola banda, debido a la pérdida de los genes que codifican la subunidad H (S. mollissima) o la subunidad M (hamster). En cualquier caso, y especialmente en los mamíferos y las aves, es corriente encontrar los patrones LDH típicos de cinco bandas formados por la hibridación entre las subunidades H y M. En los mamíferos las especies más polimórficas son los roedores, que presentan variaciones en las subunidades H (Selander, et. al.,1969; Engel et al.,1972). En Mus musculus, varios autores han encontrado patrones complejos con más de cinco bandas. Estos patrones complejos, que en ocasiones han presentado 15 bandas (Costello y Kaplan,1963; Fritz y Jacobson,1965; Klose y Spielmann,1975) han sido explicados por unos autores como debidos a dos tipos de subunidad M codificadas por dos alelos (Costello y Kaplan,1963), mientras que otros, debido a la observación de un número de bandas mayor de 15, se inclinan por la presencia de modificaciones epigenéticas de las subunidades M (Houssais,1966;Dudman y Zerner, 1973; Klose y Spielman,

1975). El trabajo reciente de Yamamura et al. (1979), en el que se han llegado a obtener 35 isoenzimas LDH en Mus musculus parece aclarar que este patrón complejo se debe a la combinación de las subunidades H con tres tipos de subunidades M, dos de los cuales se formarían por unión mediante puentes disulfuro de glutatión y cisteína a la subunidad M original. En otros roedores, como Peromyscus maniculatus se han encontrado patrones de 15 bandas que sí parecen ser debidos a la presencia de dos tipos de subunidades H codificadas por dos alelos y que hibridan con la subunidad M (Shaw y Barto, 1963). En el hombre se han descrito también variantes en las subunidades H y M en individuos aislados por lo que no se descarta que no sean variantes genéticas, sino modificaciones epigenéticas de las subunidades, asociadas a veces a situaciones patológicas (Boyer et al., 1963; Nance et al., 1963; Prasad et al., 1977). También se han descrito variantes alélicas de los genes que codifican la subunidad C de la LDH-x testicular en el hombre (Wheat y Goldberg, 1977) y en Columba livia (Zinkham et al., 1964). En Pygoscelis adeliae se han encontrado también patrones LDH de 15 bandas originados por la hibridación de subunidades M, H y H' aunque no se ha esclarecido el carácter genético o epigenético de este polimorfismo (Markert y Masui, 1969).

3.- Isoenzimas LDH y filogenia.

Para el estudio de la LDH con respecto a su filogenia se ha investigado sobre todo la composición de aminoácidos, su

secuencia, las propiedades cinéticas, las interacciones inmunológicas y las propiedades electroforéticas.

En general, se ha podido observar que especies estrechamente relacionadas tienen estructuras y composiciones de aminoácidos similares. Así, la isoenzima M_4 de las aves tiene mayor número de residuos histidina que los anfibios, mientras que los reptiles tienen un contenido intermedio. El contenido de la H_4 en isoleucina es mayor en los mamíferos que en aves y anfibios, y el contenido en arginina de las aves y los mamíferos es mayor que el de los anfibios (Wilson et al., 1964; Pesce et al., 1967). Los estudios cinéticos también han apoyado en general la idea de que las propiedades de las LDHs son tanto más parecidas cuanto más relacionadas son dos especies (Kaplan et al., 1960; Wilson et al., 1964; Salthe, 1975).

Los estudios inmunoquímicos e inmuno-electroforéticos son también coincidentes con las relaciones filogenéticas conocidas (Wilson et al., 1964; Lyra et al., 1976). Así, los anticuerpos de la isoenzima H_4 del pollo reaccionan con las isoenzimas LDH de otras especies según el orden de intensidad: aves > reptiles > anfibios > teleósteos > condrictios. También se han obtenido resultados similares con antisueros obtenidos a partir de las isoenzimas M_4 de Didelphis marsupialis, M_4 del pollo y H_4 y M_4 de la sardina al reaccionar con las isoenzimas LDH de la rata, el canguro, la paloma y la trucha (Holmes y Scopes, 1974).

También se ha utilizado la distribución de los distintos tipos de subunidades en las diferentes especies. Así, en el grupo más primitivo de peces, los agnados, las lampreas presentan un sólo gen LDH, que sintetizaría la subunidad M. Los mixini-formes sin embargo, presentan ya dos genes LDH, por lo que el caso de las lampreas se puede deber a un carácter primitivo o a la pérdida posterior del gén que codifica la subunidad H. En los condrictios se ha estudiado el orden de los esqualiformes, que presentan también dos genes LDH y patrones de cuatro isoenzimas. Los estudios inmunoquímicos no son indicativos, pero la distribución tisular y la afinidad cromatográfica permite identificar isoenzimas homólogas a la H_4 y la M_4 . En las especies de peces pulmonados y en el celacanto, que son descendientes de los antepasados de los anfibios, se han realizados pocos estudios debido a la escasez de material biológico pero se ha podido concluir la existencia de dos genes LDH (Markert et al., 1975).

En casi todos los actinopterigeos se puede demostrar, en cambio, la presencia de al menos tres genes LDH que codifican las subunidades H, M y C (oE). La subunidad C formaría la LDH-E de la retina. En los teleosteos más primitivos como los elopomorfos y osteoglossomorfos, la subunidad C aparece en muchos tejidos y conforme se sube en la escala evolutiva, su aparición se va restringiendo cada vez más, hasta quedar confinada en la retina y el hígado (Markert et al., 1975). Un caso interesante dentro de los teleósteos es el de los Salmónidos, que

debido a una diploidización relativamente reciente, presentan una gran complejidad en sus patrones isoenzimáticos (Ohno,1970; Bailey y Wilson,1968; Massaro y Markert,1968). De acuerdo con esto, los genes que codifican las subunidades H y M habrían dado por duplicación y posterior diferenciación las subunidades H,H',M y M' que están universalmente distribuídas en los salmónidos. También se han encontrado especies tetraploides en los cipriniformes (Ohno,1970;Engel et al.,1971; Shaklee et al., 1973), que presentan genes LDH duplicados. No se han encontrado en estas especies sin embargo, dos tipos de subunidad C y en algunas especies como la carpa (Engel et al.,1973) y el pez dorado (Wilson et al.,1973), sólo aparece uno de los dos tipos de subunidades H que cabría esperar en estas especies tetraploides. Estas ausencias se interpretan como debidas, bien a que aunque ha habido duplicación, la divergencia aún no es suficiente como para detectar los dos tipos, o bien a la pérdi-da de uno de los dos genes duplicados durante la evolución, __ como parece ser el caso de la carpa. También se han estudiado los patrones LDH en 67 especies de peces etheostomatídeos (Page y Whitt,1973). Estos estudios han confirmado los orígenes monofiléticos de los géneros Percina y Etheostoma.

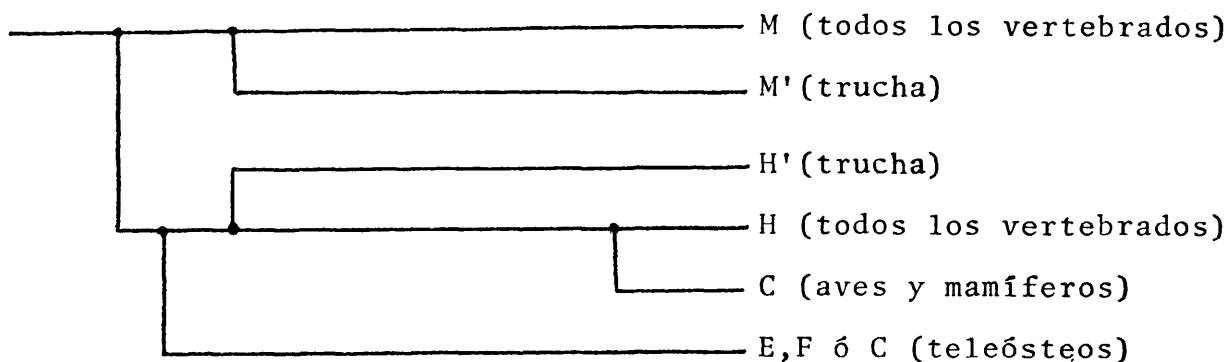
En los anfibios, la variabilidad polimórfica de la isoenzima H_4 ha demostrado ser distinta según la distribución geográfica de varias especies y subespecies del género Rana en nor-teamérica (Salthe,1969). Lo mismo se ha encontrado en las variantes polimórficas de la M_4 de Bombina en polonia (Szymura

y Swies,1979). Los polimorfismos en las subunidades LDH de los anfibios parecen seguir además a los grupos filogenéticos. Así, los ránidos presentan variación en las subunidades H, mientras que los opistocélidos presentan variación sobre todo en las subunidades M. Los estudios realizados en reptiles (Holmes,1975), aves (Allen,1961;Goldberg,1963; Zinkham et al., 1964; Wilson et al.,1964; Blanco et al.,1969; Zinkham et al., 1969; Holmes y Scopes,1974) y mamíferos (Baur y Pattie,1968; Shows et al.,1969; Koen y Goodman,1969; Engel et al.,1972; Markert et al.,1975; Blanco et al.,1976; Kiltz et al.,1977; Chang et al.,1979), también han mostrado la gran utilidad de este sistema isoenzimático en estudios filogenéticos así como el esclarecimiento de su propia evolución. De estos trabajos cabe destacar el parecido mayor entre las subunidades H y C que entre las subunidades M y C en cuanto a propiedades físicas, cinéticas e inmunológicas. Este hecho, junto con el ligamiento genético entre los loci que codifican las subunidades H y C en la paloma (Zinkham et al.,1969), hace pensar que el gen Ld-C viene del gen Ld-H.

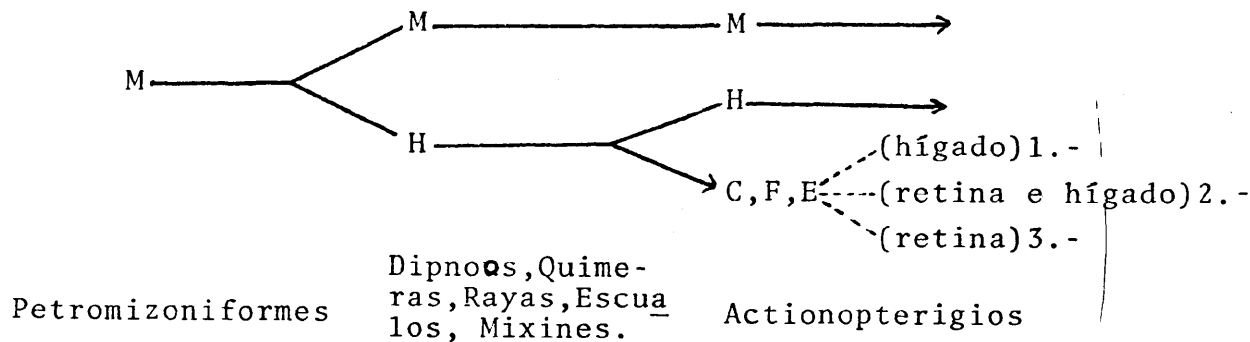
A pesar de la falta de datos extensos referentes a la estructura primaria de las distintas subunidades LDH en las diferentes especies, Holmes y Scopes (1974), propusieron el primer modelo de la evolución de los genes de la LDH, basándose en parte de los datos antes citados. Este modelo se resume como:

Gen LDH

"ancestral"



Los autores suponen un modelo de duplicación y posterior diferenciación como mecanismo de evolución génica. Markert et al., (1975) apoyaron este modelo y ampliaron el esquema para el caso de los peces:



1.- Cipriniformes y Gadiformes

2.- Mormiriformes, Osteoglossiformes, Anguiliformes, Elopiformes, Acipenseriformes, Amiiformes.

3.- resto de los que lo presentan

Según estos autores, además, el origen de las subunidades

M y H a partir de la subunidad ancestral incluiría cuatro etapas fundamentales: 1) Duplicación (por tetraploidización, aneuploidia, duplicación en tandem o sobrecruzamiento desigual); 2) Divergencia funcional y estructural (estructura 1a y 3a, cinética y tasa de recambio); 3) Regulación diferencial (especialización ontogénica, subcelular, tisular o metabólica) H y M; 4) Especialización divergente (regulación y evolución independientes, funciones metabólicas diferentes). Desde entonces hasta la actualidad los datos obtenidos están en concordancia con estos esquemas, aunque los modelos propuestos podrían ser ya ampliados con más detalle en los diversos grupos.

4.- Isoenzimas LDH y ontogenia

A.- Actividad Total y específica

El estudio de las variaciones de las actividades enzimáticas durante el desarrollo es de una gran importancia para el conocimiento de la ontogenia desde un punto de vista molecular. Quizás en la LDH los estudios espectrofotométricos no se han desarrollado lo suficiente, ya que la presencia de isoenzimas ofrece un campo experimental mucho más atractivo. Sin embargo, se han realizado trabajos en toda la serie de los vertebrados, estudiando los niveles de actividad LDH durante el desarrollo. En el caso de los peces, diversos autores han medido la actividad LDH. Así, se ha descrito un aumento importante de la actividad específica (por mg. proteína) LDH en Oryzias latipes

durante la eclosión (Nakano y Hasegawa,1971). Un trabajo posterior, sin embargo, ha mostrado que en realidad existe un aumento progresivo de dicha actividad desde el estado 26 (pigmentación de la retina) hasta el final del período embrionario y que el aumento brusco anteriormente observado se debe a un descenso de la cantidad de proteínas que se da en la eclosión, más que a un aumento de síntesis de LDH. Esta LDH está representada además en un 87-95% por LDH1. Además, desde la fecundación hasta el estado 26, es decir, durante la segmentación gastrulación, neurulación y organogénesis posterior, tanto la actividad total como específica se mantiene constante en Oryzias latipies (Philipp y Whitt,1977). Otros estudios realizados en Bracydanio (Frankel y Hart,1977) y Barbus conchoni (Frankel,1980), también han demostrado una constancia en los niveles de actividad LDH en los primeros estados del desarrollo. Existe sin embargo, un trabajo (Boulekbache et al., 1969) en Salmo irideus que muestra un aumento notable de la actividad total LDH durante la gastrulación con respecto a la blástula. Este pico desciende al final de la epibolia a niveles semejantes a los de la segmentación.

En los anfibios se han realizado también pocos estudios en este sentido. Sin embargo, uno de los primeros trabajos, realizado sobre geles en Rana temporaria (Chen,1968), ya refiere un aumento de actividad LDH durante la gastrulación. Otros autores (Faulhaber y Lyra,1975) han realizado un estudio bastante completo en este sentido en Triturus alpestris,

Triturus vulgaris, Ambystoma mexicanum y Xenopus laevis. En A. mexicanum, las actividades total y específica (0,3 U/embrión y 2 U/mg.prot.) son mayores que las de las otras tres especies (0,1 U/embrión y 1 U/mg.prot.) al inicio del desarrollo, pero se igualan en las últimas etapas del desarrollo embrionario. En las cuatro especies se obtiene además, un pico de actividad LDH, coincidiendo con la gastrulación en Triturus y Xenopus y con la gastrulación y la neurulación en Ambystoma. El aumento es aproximadamente de un 25% en la actividad total y de un 15 a un 20% en la actividad específica LDH. Después de la gastrulación, la actividad específica se mantiene constante hasta el final del desarrollo embrionario. La actividad total LDH de Triturus alpestris y Xenopus laevis, sufre, sin embargo, un aumento continuo desde el estado 26 (contracción muscular espontánea) hasta el final de la etapa embrionaria. Estos autores han calculado también en los tres géneros citados, la concentración de piruvato óptima para el desarrollo de la reacción de la LDH. Esta concentración resultó estar dentro del rango 1,2-1,4mM de piruvato en los tres casos. En la metamorfosis tanto natural como inducida por la tiroxina, se ha obtenido en Rana catesbiana un descenso de actividad LDH, de un 60% en el hígado (Degroot y Cohen, 1962) y de un 39-45% en el hígado, músculo caudal y cerebro (Kim et al., 1965).

En las aves no existen datos conocidos de actividad LDH durante la gastrulación, aunque hay referencias de cambios entre los días 7 y 21 de desarrollo. Estas variaciones son muy

distintas según el tejido considerado (Lindy y Rajasalmi, 1966). En los mamíferos, la mayoría de los trabajos en los primeros estados del desarrollo se han realizado en el ratón y el conejo. En el ratón, ya los primeros estudios indicaron que los niveles enzimáticos de la LDH iban aumentando durante la oogene-
sis (Brinster, 1968). Estudios posteriores (Epstein et al., 1971; Mangia y Epstein, 1975), han confirmado este hecho que algunos autores relacionan con la gran utilización de piruvato y la presencia de LDH 1 como isoenzima predominante en este estado (Mangia et al., 1976). En la fecundación no se producen altera-
ciones en los niveles de actividad, que son mucho mayores que los de los tejidos adultos ($28 \mu\text{M}$ NADH oxidado/min./mg. proteí-
na). La actividad (total y específica) se mantiene constan-
te hasta el estado de 8 células y después cae al 10% de su valor en el estado de blastocisto anterior a la implantación (Brinster, 1973). Se ha demostrado que este descenso no se debe a una disminución de síntesis, sino a un aumento de la degra-
dación de la enzima (Erickson et al., 1975; Mangia et al., 1976). En el conejo, la actividad inicial es mucho menor que en el
ratón ($0,38 \mu\text{M}$ NADH oxidado/min./mg. proteína). Tampoco hay
cambios en la fecundación y no hay descenso de actividad du-
rante la segmentación sino que la actividad total y específi-
ca aumenta en el blastocisto de cuatro y cinco días, de for-
ma que en el momento de la implantación se alcanzan niveles
similares a los del ratón (Schultz y Browder, 1975). No dispo-
nemos de datos respecto a la gastrulación. Brinster (1979),
ha realizado medidas de actividad LDH en un gran abanico de

especies de mamíferos, obteniendo una gran variabilidad en los resultados, desde los 0,81 n M NADH oxidado/min./oocito en el ratón, hasta los 0,02 n M NADH oxidado/min./oocito en la mujer. En general, los roedores presentaron los niveles más altos y los primates los más bajos.

B.- Isoenzimas.

La existencia de distintas formas moleculares o isoenzimas ha sido utilizada en numerosas investigaciones para estudiar el momento de la expresión fenotípica del genotipo del embrión cuando no todas las isoenzimas del adulto están presentes en el huevo fecundado. También se han utilizado estos estudios para relacionar este momento de expresión génica con la diferenciación celular. La existencia de hasta cinco genes LDH diferentes en los teleósteos ha hecho que este sea uno de los grupos más estudiados. En casi todas las especies de teleósteos estudiadas, parece existir una expresión secuencial de las subunidades H, después las M y por último las C (ó E). En algunos casos, como en Fundulus heteroclitus (Whitt,1970) o en Lepomis cyanellus (Champion y Whitt,1976), las subunidades H y M están presentes ya en el huevo fecundado. En el resto de las especies siempre se encuentra al menos la subunidad H en el cigoto. La subunidad C aparece más tarde en el desarrollo coincidiendo con la formación del hígado en Fundulus heteroclitus (Whitt,1970), Oryzias latipes (Nakano y Hasegawa,1971), Salmo gairdneri (Wright et al.,1975) y Micropterus salmoides

(Philipp y Whitt, 1977), o con la eclosión en Erimyzon sucetta (Shakle et al., 1974). Otros autores sin embargo, utilizando extractos más concentrados, han demostrado la aparición de la subunidad C en Oryzias latipes coincidiendo con la formación del ojo (Philipp y Whitt, 1977). Además, las especies en las que la expresión del gen Ld-c está retrasada hasta el momento de la formación del hígado, son precisamente aquellas que presentan isoenzima LDH-C₄ en el hígado. Así, se observa una correlación entre el tipo de isoenzima y la diferenciación orgánica. Además, en aquellas especies en las que existen genes LDH duplicados, como en Salmo gairdneri o en Erimyzon sucetta, se ha podido comprobar que la expresión de los genes Ld-h¹ y Ld-h² o de los genes Ld-m¹ y Ld-m² es simultánea sea cual sea el momento de expresión.

En los anfibios es frecuente que tanto las subunidades H como las M estén ya presentes en el huevo fecundado. Se ha tenido que aprovechar entonces la presencia de polimorfismos bioquímicos en la LDH o la utilización de cruces interespecíficos, para identificar el momento de expresión del genotipo LDH del embrión. El huevo de los anfibios es un oocito enormemente cargado de proteínas y ARN mensajeros sintetizados por el genoma materno. Debido a esto, las primeras fases del desarrollo embrionario ocurren con la utilización de proteínas "maternas" hasta un estado bastante avanzado. Ya en 1965, Salthe et al., observaron que en Rana pipiens, Rana palustris y Rana sylvática, no se producen cambios observables en el pa-

trón electroforético de la LDH hasta el estado 19 (latido cardíaco). Utilizando un polimorfismo de las subunidades H (H^a , H^b , H^c) existente en Rana pipiens, y realizando cruzamientos entre los distintos fenotipos, se ha podido comprobar que el genotipo LDH del embrión no aparece hasta el estado 19 y el efecto materno persiste hasta el estado 25 (inicio de la alimentación) (Wright y Moyer, 1966, 1968). Este resultado coincide además, con la observación de que en los anfibios existe un aumento de síntesis de ARN a partir de la gastrulación (Brachet, 1975) y de que en Rana pipiens aumenta agudamente la síntesis de proteínas y de ribosomas en el estado 18 (movimiento muscular) (Brown y Caston, 1962). También se ha observado un aumento de la síntesis de ARN ribosómico después de la gastrulación en Xenopus laevis (Brown y Littna, 1964). En un trabajo posterior Wright (1975) ha demostrado en Rana pipiens la persistencia de isoenzimas maternas en 12 sistemas enzimáticos diferentes, hasta el estado 16 (tubo neural) o el estado 24 (opérculo derecho cerrado), según la enzima considerada. El tratamiento de embriones híbridos de Rana pipiens con actinomicina-D y puromicina, ha permitido comprobar a este autor, que la aparición del fenotipo embrionario supone la existencia de transcripción y traducción y que estas dos fases son secuencial e inmediatamente anteriores en dos o tres estados a la aparición a nivel fenotípico del genotipo embrionario. En otras especies como Xenopus laevis, Triturus alpestris o Triturus vulgaris, gracias a la presencia exclusiva de subunidades H en el cigoto, se ha podido observar, también, este

efecto materno, no visualizándose subunidades M hasta el estado 26 (respuesta muscular) (Faulhaber y Lyra, 1975). Mediante la obtención de híbridos nucleocitoplásmicos por transplante de núcleos entre las especies Pleurodeles waltlii y Pleurodeles poireti se ha podido comprobar también que los genes LDH nucleares no se expresan hasta el estado 28 (latido cardíaco) y que las isoenzimas citoplásmicas de origen materno desaparecen totalmente en el estado 38 (inicio de la alimentación) (Gallien et al., 1971).

Es conocido que en toda la escala de los vertebrados, los distintos tipos de subunidades de la LDH presentan una distribución diferente por tejidos, de forma que las subunidades H predominan en el corazón y el cerebro y las subunidades M predominan en el músculo esquelético. En todas las especies estudiadas, los patrones LDH de los órganos de los adultos se van alcanzando progresivamente durante el desarrollo, como también ocurre en Discoglossus pictus (Alonso et al., 1976). Estos cambios, tanto en el desarrollo como en el adulto, se deben en el caso de la LDH a una expresión génica diferencial, a diferentes tasas de recambio en los distintos tejidos, o a la existencia de inhibidores específicos de las distintas subunidades. De hecho, se ha demostrado en la rata que la tasa de síntesis de la LDH-1 en el corazón es ocho veces mayor que la de la LDH-5, mientras que en el músculo esquelético la LDH-5 se sintetiza casi dos veces más rápidamente que la LDH-1. Además, la tasa de degradación es ocho veces mayor en la LDH-5 que en

la LDH-1 en el corazón, y veintidós veces mayor en la LDH-1 que en la LDH-5 en el músculo esquelético (Fritz et al., 1969,1973). Se han descrito también inhibidores específicos de la LDH-1 y la LDH-5, pero el papel de estos inhibidores in vivo no está claro (Schoenenberger y Wacker,1966; Lehnert y Berlet,1979). Se ha demostrado también el efecto de las hormonas sobre las isoenzimas LDH. Así, la administración de estradiol a ratas y conejas inmaduras estimula selectivamente la síntesis de subunidades M en el útero. Esta estimulación es reversible y se bloquea en presencia de actinomicina D (Goodfriend y Kaplan,1964). En los renacuajos de Rana catesbeiana se ha demostrado también que tanto la metamorfosis natural como la inducida por la tiroxina provoca un aumento de subunidades H (Dergroot y Cohen,1962; Kim et al.,1966). El tratamiento con tiroxina provoca también la aparición precoz de las isoenzimas LDH3 y LDH4 en Ambystoma mexicanum (Ouedraogo y Chalumeau-Le Foulgoc,1973).

5.- Función fisiológica de la LDH y tensión de oxígeno.

Desde el descubrimiento de los dos tipos de subunidades principales (H y M) de la LDH de los vertebrados, se han ido acumulando datos que apuntan hacia una función fisiológica diferente de las isoenzimas LDH 1 (H_4) y LDH 5 (M_4). La mayoría de estos datos se refieren a la distribución tisular diferencial de estas isoenzimas y a sus diferentes grados de afinidad e inhibición por sus substratos principales, el piruvato

y el lactato. El resultado ha sido la elaboración de la llamada "teoría aerobia-anaerobia" que supondría un papel preferencial de la isoenzima LDH-5 como piruvato reductasa y de la LDH-1 como lactato oxidasa.

A.- Distribución tisular.

La distribución tisular de la LDH en los vertebrados parece confirmar la teoría aerobia-anaerobia, ya que se puede afirmar que en casi todas las especies estudiadas, la LDH-1 y las subunidades H predominan en los tejidos más aerobios, como el corazón, mientras que la LDH-5 y las subunidades M predominan en los tejidos más anaerobios como los musculares y en particular en el músculo esquelético. Esta es también la situación general en los anfibios. Así, hemos encontrado un 82-99% de subunidades M en el músculo esquelético y un 58-74% de subunidades H en el músculo cardíaco en Discoglossus pictus y Rana ridibunda (Alonso y Torrellas, 1973; de Costa et al., 1978). Se ha argumentado sin embargo, que esta teoría aerobia-anaerobia no tendría una aplicación general debido a la presencia de dos excepciones a la regla, sistemáticamente repetidas (Vesell, 1975). La primera está constituida por los eritrocitos de los mamíferos, que aún siendo muy anaerobios, presentan un % H desde el 5% en el ratón a un 100% en el conejo, con toda la gama intermedia según las especies (Fine et al., 1963). La razón de este hecho no está aclarada, aunque se ha sugerido que el tipo de LDH podría carecer de importancia en este caso debido a la baja tasa metabólica de los eritrocitos o a la oxi-

dación del NADH por otras enzimas como la metahemoglobín reductasa (Everse y Kaplan,1975).

El caso del hígado es similar, ya que también se pueden encontrar casos desde el 5% de subunidades H del hombre, la rata, el ratón, el hamster o el gato, hasta el 90-95% de H de la cabra, la vaca, el ciervo o la oveja (Fine et al.,1963). Según Ogiwara (1975) esta distribución estaría relacionada con los hábitos alimenticios, ya que en los mamíferos, los hervíboros presentan predominio de subunidades H y los carnívoros predominio de subunidades M. El hígado de los hervívoros rumiantes es más rico en ácidos grasos que se convierten a glucosa. Se ha propuesto la posibilidad que el hígado de los hervívoros tuviese un metabolismo oxidativo más alto que el de otros mamíferos y que esto estuviese relacionado con la conversión de ácidos grasos a glucosa (Cahn et al.,1962; Kaplan y Goodfriend,1964). Esto está apoyado por la observación de que el cambio de la dieta normal a una dieta rica en almidón, provoca un ligero aumento de subunidades H en el hígado de rata y humano (Ogiwara,1975). Otros autores, sin embargo, relacionan la distribución de las isoenzimas LDH en el hígado de los mamíferos con su comportamiento específico. Así, las especies que ante la presencia de un predador reaccionasen escondiéndose o atacando (gato,rata,ratón), tendrían, como se observa, abundancia de subunidades M, mientras que las especies que se dan a la huida (oveja, cabra, vaca, ciervo), tendrían como también se observa, predominancia de subunidades H.

Esto sería ventajoso para este último grupo de especies, ya que durante la huída se produce gran cantidad de lactato en el músculo y este lactato sería catabolizado más eficazmente en el hígado con la presencia de las subunidades H (teoría aerobia-anaerobia) con lo que se evitaría un descenso agudo del pH plasmático. En cualquier caso esto no explicaría la abundancia de subunidades M en el otro grupo de mamíferos (Everse y Kaplan, 1975). En los anfibios se ha descrito también una abundancia de subunidades M en el hígado en especies como Discoglossus pictus que también reaccionan escondiéndose, mas que huyendo prolongadamente ante la presencia de un predador (Alonso y Torrellas, 1973). Experimentos realizados en nuestro laboratorio, no apoyan sin embargo, la explicación de Ogihara, ya que el cambio de una dieta rica en hidratos de carbono a una dieta proteica en larvas de Discoglossus pictus, no provoca un aumento de subunidades M, aunque sí hay un acortamiento del intestino (Valero et al., 1977).

B.- Inhibición por sustrato.

El otro puntal de la teoría aerobia-anaerobia son las propiedades catalíticas de la LDH y fue propuesto inicialmente por Plageman et al., (1960). Posteriormente se comprobó la existencia de propiedades catalíticas distintas para la LDH-1 (H_4) y la LDH-5 (M_4) (Cahn et al., 1962; Kaplan, 1968). La isoenzima LDH-1 se inhibe por concentraciones de sustrato (piruvato) altas, que no afectan a la LDH-5, por lo que esta última isoenzi

ma sería más eficaz en tejidos con tasas glucolíticas muy altas. Inversamente, en condiciones normales, la presencia en el músculo cardíaco de isoenzima LDH-1, que se inhibe por exceso de piruvato, evitaría la reducción de este metabolito a lactato, garantizando así su oxidación completa a CO_2 y H_2O . Se ha elucidado también, por estudios in vitro, que la inhibición de la LDH-1 se debe a la formación de un complejo abortivo ternario entre la enzima, el NAD^+ y el enol-piruvato (Everse y Kaplan, 1973). Varios autores han cuestionado este mecanismo ya que las diferencias de inhibición entre las isoenzimas LDH no se darían en las condiciones existentes in vivo (Wuntch et al., 1969; Vesell, 1975). El complejo abortivo ternario sería también un artefacto obtenido in vitro, ya que requiere la presencia de la forma enólica del piruvato y no se forma con el cetopiruvato que es la especie predominante in vivo (Vesell, 1965; Vesell y Pool, 1966; Wuntch et al., 1969, 1970). Estudios recientes apoyan sin embargo, la posibilidad de la existencia in vivo del complejo ternario en mamíferos (Everse y Kaplan, 1975) y anfibios (Salthe, 1975) indicándose además que las concentraciones de sustrato presentes in vivo posibilitan la acción de la LDH-5 como piruvato reductasa mientras que la LDH-1 está inhibida por exceso de sustrato. Según Everse y Kaplan (1975) el enolpiruvato se formaría en la célula por una enolización no enzimática del cetopiruvato. Esta enolización sería el factor limitante para la formación del complejo y aunque la concentración celular del enolpiruvato es baja, la tasa de formación del complejo ternario inactivo sería

suficientemente alta como para que tuviese significado fisiológico. La demostración de que el corazón de los mamíferos utiliza lactato hasta como un 60% de su fuente de energía cuando el nivel de lactato arterial es alto, da apoyo a esta teoría (Bing et al., 1953; Krasnow et al., 1962; Bing, 1965; Hammond et al., 1976; Hochachka, 1980). Así, en el corazón, en condiciones normales se oxidaría glucosa hasta piruvato con formación de NADH. El piruvato pasaría a acetil-coA y entraría en la mitocondria para su oxidación total a CO_2 y H_2O . El NADH entraría también en la mitocondria a través de las lanzaderas del malato-aspartato o del α -glicerofosfato. La formación del complejo abortivo ternario LDH_1 - NAD^+ -enolpiruvato evita la transformación del piruvato en lactato, permitiendo la metabolización oxidativa total del piruvato. Además, cuando la concentración de lactato (Everse y Kaplan, 1973) y de NADH (Kaplan et al., 1968) celulares aumentan, se produce una disociación rápida del complejo ternario y la LDH-1 comienza a oxidar el lactato a piruvato. Esta disociación se ha comprobado in vivo. Así, en condiciones de hipoxia, el aumento de concentración de lactato (originado en otros tejidos) y de NADH provocaría la oxidación del lactato en el corazón (Everse y Kaplan, 1975). Esta teoría está apoyada además por el hecho de que la LDH-1 posee una afinidad mayor por el NADH y la LDH-5 por el NAD^+ . Hay evidencias recientes de que parte de la LDH-5 muscular se encuentra unida a membranas en una forma inactiva. El aumento de la tasa celular de NADH/NAD^+ provoca la liberación de la LDH-5 de las membranas y por tanto su activación como

piruvato reductasa que restablece de nuevo la tasa NADH/NAD^+ (Hultin et al., 1966; Melnick y Hultin, 1973; Ginard y Markert, 1975).

El trabajo exhaustivo de Salthe (1965) realizado en 85 especies de anfibios apoya también la teoría aerobia-anaerobia con un enfoque distinto. Este autor mostró que la tasa de inhibición por piruvato estaba correlacionada con el contenido en oxígeno del nicho ecológico en las distintas especies. Así, conforme se iba de especies que viven en aguas estancadas a especies aéreas, pasando por las que viven en aguas corrientes y las semiacuáticas, la tasa de inhibición de la LDH cardíaca por el piruvato va aumentando. De esta forma, las especies más aerobias aseguran la oxidación completa de la glucosa mientras que las más anaerobias sólo presentan inhibición por piruvato a concentraciones muy altas de este metabolito. Esta característica de la LDH de los anfibios, parecía estar relacionada también con parámetros fisiológicos como el consumo de oxígeno, el grado de capilarización pulmonar y cutánea, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y el área de los globulos rojos.

Otro tipo de pruebas importantes respecto a la función fisiológica de las isoenzimas LDH son los casos de las especies que viven en las grandes alturas, las especies buceadoras y los fenómenos de aclimatación y aclimatización a las distintas tensiones de oxígeno.

C.- Especies buceadoras.

En las especies de aves y mamíferos que realizan inmersiones prolongadas, se produce un descenso de la tensión de oxígeno arterial que llega a afectar a todos los tejidos, _incluído el cerebro (Scholander, 1942). Este descenso se debe a la interrupción del intercambio de gases con el ambiente (Andersen, 1966). Como respuesta a este descenso en la tensión de oxígeno durante el buceo, se han desarrollado acomodaciones a nivel fisiológico para contrarrestar este efecto. Se ha concluído, sin embargo, que estas acomodaciones a nivel fisiológico (bradicardia, redistribución sanguínea, etc.) no son suficientes como para explicar en su totalidad esta resistencia a la hipoxia de los animales buceadores (Simon et al., 1974), por lo que se ha sugerido también, la implicación de aclimataciones a nivel bioquímico. De entre estas, una de las más notables parece ser el tipo de patrón de isoenzimas LDH. Así, se ha encontrado un patrón LDH caracterizado por una presencia importante de LDH 1 y 2 en el músculo esquelético (ade más de LDH 5 y 4) y de LDH 4 y 5 en el corazón (además de LDH 1 y 2) en el pinguino Pygoscelis adeliae, que es un ave bucea dora (Markert y Masui, 1969). Estos autores interpretan que durante el buceo, debido a la gran acumulación de lactato, se rían precisos todos los tipos de LDH. La regla no parece ser esta, sin embargo, ya que en general se observa un porcenta je muy aumentado de subunidades M en las especies buceadoras. Un caso extremo es el ave buceadora Somateria mollissima, que

presenta única y exclusivamente LDH-5 (M_4) en todos los tejidos estudiados (cerebro, músculo ventricular y músculo gastrocnemio) (Blix y From, 1971; Blix et al., 1973).

En un estudio realizado en el cerebro, corazón y músculo esquelético de seis especies de cetáceos se ha observado un porcentaje de subunidades M superior al de otros mamíferos no buceadores como la cabra o el ratón. Las diferencias eran especialmente acusadas en el corazón, que llega a tener hasta un 45% de subunidades M. Se pudo comprobar también que el corazón de los odontocetos, que realizan buceos más profundos y prolongados que los mystacocetos (Heezen, 1957; Tomilin, 1967), presenta un porcentaje de subunidades M mucho mayor que el corazón de los mystacocetos (Shoubridge et al., 1976). En Castor fiber se ha encontrado también un porcentaje alto de subunidades M en el corazón y el cerebro en comparación con mamíferos no buceadores como la cabra. El músculo esquelético mostró, sin embargo, pobreza en subunidades M. Esto se relaciona con la gran abundancia de fibras de contracción lenta en el castor (Messelt y Blix, 1976).

D.- Aclimatación y aclimatización a la tensión de oxígeno.

El efecto de la aclimatación a tensiones de oxígeno bajas sobre el patrón de isoenzimas LDH ha sido ampliamente estudiado en los mamíferos, mostrando en general como respuesta un aumento del porcentaje de subunidades M de las isoenzimas

(Wroblenski y Gregory,1961; Wieme y Maercke,1961; Goodfriend et al.,1966; Mager et al.,1968; Anderson y Bullard,1971). Más recientemente se ha estudiado el efecto de la hipoxia normo o hipobárica en distintos tejidos de la rata y el ratón. Así, la hipoxia (72mm Hg O₂) hipobárica aplicada durante 57 días en la rata provoca un aumento del 37,5% en la actividad específica de la LDH y del 11,8% en el porcentaje de subunidades M del corazón (Penney,1974). En el corazón de rata y ratón, la aclimatación a hipoxia normobárica (76mm Hg O₂) aumenta la tasa LDH4/LDH1 en un 60% al cabo de una semana y la vuelta al aire atmosférico provoca la recuperación de los valores normales (Binette et al.,1977). Una hipoxia normobárica (76mm Hg O₂) provoca al cabo de 44 días en el pulmón de rata un aumento del 13% en la LDH5 y del 9% en las subunidades M, un descenso del 73% en la LDH1 y del 25% en la LDH2, y un aumento del 138% en la actividad específica; la aclimatación a 608mm Hg O₂ provoca en cambio en el pulmón, un descenso del 33% en la LDH5 y del 19% en las subunidades M y un aumento del 47% en la LDH2 y del 100% en la LDH-1; no hubo cambios en el hígado, ni en hipoxia ni en hiperoxia (Chavapil,1976). Se han obtenido también resultados similares durante el desarrollo embrionario del pollo. Al incubar embriones de pollo en hipoxia normobárica (110mm Hg O₂) se produce un aumento del 10 al 38% en las subunidades M, en el hígado, el corazón y el músculo pectoral, a los 15 días de incubación en hipoxia. El aumento más acusado (38%) se obtuvo en el hígado y el menos intenso en el músculo (10%). La incubación de estos mismos embriones también duran-

te 15 días en hiperoxia (304mm Hg O₂), provoca asimismo un descenso de las subunidades M, de un 11% en el hígado, un 18% en el corazón y un 21% en el músculo. La actividad total de la LDH no mostró, sin embargo, variaciones en hipoxia ni en hiperoxia respecto a los controles (Lindy y Rajasalmi, 1966).

En algunos casos, sin embargo, no se han detectado variaciones en el patrón de isoenzimas con la hipoxia. Así, la aclimatización en ratas a 3.400 m de altura (Vergnes et al., 1976), la hipoxia normobárica (108mm Hg) en el pez Lepomis cyanellus (Shaklee et al., 1977) o una hipoxia extrema (3,8mm Hg O₂) aplicada durante 1,5 min. en la rata (Broniszewska-Ardelt y Wroblewski, 1975) no han provocado cambios en el patrón LDH ni en su actividad en el miocardio y el cerebro de la rata ni en 12 tejidos distintos de Lepomis cyanellus. Quizá el bajo nivel de hipoxia empleado en unos casos (108mm Hg O₂ y 103mm Hg O₂ = 3.400m.) o el bajo tiempo de exposición en otros (1,5 minutos), pueda explicar esta falta de respuesta. En el experimento de aclimatización a la altura en la rata, se pudo observar, sin embargo, un aumento de la K_M aparente para el piruvato en el grupo de altura al cabo de 12 semanas. Los autores interpretan este aumento como debido a un inicio de predominio de las subunidades M, que tienen una afinidad menor por el substrato, con lo que el cambio sería también adaptativo respecto al oxígeno ambiente (Vergnes et al., 1976).

Se han realizado también experimentos in vitro con fibro-

blastos y células epiteliales humanas cultivadas en 22,8mm Hg de oxígeno. En ambos tipos celulares se observó un descenso del 30 al 50% en la relación subunidades H/subunidades M a las 40 horas de cultivo, respecto a los grupos control (Schroeder et al.,1975). También se ha podido comprobar un aumento del 17 al 42% de las subunidades M en el miocardio humano (Hammond et al.,1976) y en la retina y la córnea del conejo (Bours et al.,1977) en condiciones de isquemia. En el caso de la retina se produjo un aumento del 50% en la LDH 5 y la desaparición total de la LDH-2 en el grupo isquémico.

En los anfibios no conocemos ningún trabajo del efecto de la aclimatación o aclimatización a la tensión de oxígeno sobre el sistema LDH. Sólo existen algunos datos cinéticos que apoyan el papel aerobio-anaerobio de las isoenzimas (Salthe,1966; 1975).

6.- La LDH en los procesos patológicos.

Se han descrito numerosas correlaciones entre cambios en los patrones isoenzimáticos o en la actividad total y específica de la LDH y varios procesos patológicos como los tumores, alteraciones en el miocardio, infecciones, etc. En muchos casos, los cambios en el patrón de isoenzimas LDH son previos a la manifestación del estado patológico. De ahí el interés clínico cada vez más relevante de el estudio de los niveles de LDH para el diagnóstico precoz de muchos fenómenos patológicos.

a.- Tumores.

En el caso de muchos tumores cancerígenos se ha encontrado repetidas veces un aumento de subunidades M. Se ha interpretado este hecho como un punto más de apoyo a la teoría aerobia-anaerobia del papel fisiológico de las isoenzimas LDH, ya que es conocido que las células de los tumores malignos suelen presentar dependencia de procesos anaerobios como fuente de energía (Warburg,1956). Así, se han encontrado aumentos de las subunidades M en el patrón de isoenzimas LDH en tejidos neoplásicos humanos (Goldman et al.,1964), tumores inducidos por el simian virus SV-40 (Prasad et al.,1972), carcinomas del endometrio humano (Fottrell et al.,1974), tumores y metástasis de las mamas y el pulmón del ratón (Tereschenko et al., 1975), cánceres uterinos humanos (Goldberg,1974; Hamada,1975; Marshall et al.,1979), células tumorales de Ehrlich que presentan sólo LDH-5 (Andersson et al.,1978) y en astrocitomas de grado 3 y 4 y carcinomas con metástasis del cerebro humano (Rabow y Kristensson,1976). En muchos de estos casos se observó también un aumento marcado de actividad total y específica LDH que suele ser interpretado como resultante de un aumento de síntesis de subunidades M. En algunos tipos de tumores, sin embargo, como es el caso de los melanomas tanto en H. Sapiens (Prasad et al.,1974) como en el pez Xiphophorus helleri (Ahuja et al.,1975; Schuwab et al.,1976), no hay cambios en el patrón de isoenzimas (caso del hombre) o incluso hay un aumento de subunidades H (X.helleri). También se han

descrito aumentos de subunidades H en los astrocitomas de grado 1 y 2 y en oligodendrogliomas cerebrales en el hombre (Rabow y Kristenson, 1976). Algunos autores han interpretado estos resultados como debidos a que estos tumores no dependen de la glucolisis anaerobia para su desarrollo y crecimiento (Schwab et al., 1976).

b.- Lesiones musculares.

Cuando se produce una lesión en un tejido, la rotura de las células del mismo provoca una liberación de las isoenzimas LDH del tejido al plasma sanguíneo. Debido a esto, las medidas del patrón de isoenzimas en el suero es utilizada en clínica para saber cual es el tejido lesionado, ya que cada tejido tiene un patrón LDH distinto y por tanto provocará cambios distintos en el plasma. Una de las lesiones que han sido más estudiadas ha sido la distrofia muscular. En esta enfermedad se ha encontrado un aumento de las subunidades H en el músculo, hecho que algunos autores han interpretado como reversión al modelo isoenzimático muscular fetal (Dreyfus et al., 1962; Dawson y Kaplan, 1965). Un estudio reciente, midiendo simultáneamente la LDH del músculo y el suero ha mostrado un aumento de la actividad total y de las subunidades M en el plasma y un descenso de las subunidades M en el músculo distrófico. Se interpreta este hecho como una liberación de las enzimas del músculo dañado al plasma (Yasmineh et al., 1978). Existe sin embargo, un trabajo opuesto a este (Somer et al., 1973)

cuyos resultados han sido criticados por consideraciones metodológicas (Yasmineh et al.,1978).

En el caso del corazón, algunas enfermedades como el infarto de miocardio provocan un aumento de actividad total LDH en el plasma, especialmente LDH 1, al cabo de 6 ó 12 horas (Vesell,1975;Van der Laarse et al.,1979). Se ha descrito también un aumento de las subunidades M ventriculares en la hipertrofia miocárdica (Barrie y Harris,1976).

c.- Otras patologías.

Se ha demostrado también la elevación de la LDH 1 y 2 en el plasma después de contusiones cerebrales (Rabow et al.,1971; Rabow,1972). Estos autores han demostrado también la utilidad de las determinaciones de los niveles de isoenzimas LDH después de las operaciones de aneurismas intracraneales, para detectar la existencia de daños celulares cerebrales debidos a la intervención quirúrgica (Rabow y Tibbling,1975). Se han descrito aumentos de la LDH-1 en el plasma correlacionados con anemias perniciosas y hemolíticas (Starkweather et al.,1965) y en lesiones renales producidas por administración de cloruro de mercurio (Cornish et al.,1970). También hay aumentos marcados de LDH-5 en el plasma en relación con enfermedades hepáticas, como la hepatitis y la toxicidad hepática producida por el tetracloruro de carbono (Wieme y Van Maercke,1961) o la infección de los hepatocitos por adenovirus (Shekhtman,1978). Du--

rante los embarazos ectópicos se produce un aumento de la LDH plasmática por encima de los valores normales (Ohel et al., 1979) y ocurre lo mismo en mujeres con hipertensión crónica durante el embarazo (Makkonen et al., 1980). Se ha descrito un caso en el hombre de aumento de subunidades M en la trisomía del brazo corto del cromosoma 11 (Rethoré et al., 1980). Este hecho coincide con la localización del gen que sintetiza la subunidad M en el cromosoma 11 (Boone et al., 1972). Se han encontrado también aumentos de la actividad LDH-1 en individuos con trozos de cromosoma 12 extra (Rethoré et al., 1975), que es el cromosoma que lleva el gen que codifica las subunidades H en Homo sapiens (Chen et al., 1973). La delección del brazo corto del cromosoma 11 también provoca una disminución de la actividad de la LDH-5 (Francke et al., 1977). Se ha descrito también recientemente en el hombre la presencia de una banda supernumeraria de la LDH o LDH₆ que emigra más lentamente que la LDH-5 (Cabello et al., 1980). De los 18 enfermos que presentaron esta "LDH-6", 15 murieron a los pocos días y la mayoría padecían arterioesclerosis con hiperemia hepática y azoemia renal.

7.- Localización de la LDH.

A.- Localización subcelular

a.- LDH-5

Aunque la LDH es una enzima presente en la fracción solu-

ble del citoplasma, se han descrito distintas localizaciones en los distintos compartimentos celulares para la LDH-1 y la LDH-5. Así, se ha observado que la LDH-5 se une en parte a la fracción particulada del músculo esquelético, mientras que esto no se da prácticamente en la LDH-1 (Ehman y Hultin, 1973). Además, la fracción soluble de la LDH-5 se inhibe por exceso de sustrato, pero esto no ocurre en la fracción unida a membranas. Esto se ha interpretado como una ventaja, ya que la inhibición por sustrato mediante la formación del complejo ternario enzima-NAD⁺-piruvato, según Griffin y Criddle (1970) implicaría la disociación previa de la LDH en sus monómeros y la unión a la estructura particulada preservaría la integridad tetramérica de la enzima, impidiendo así la formación del complejo inactivo. Por otra parte, se ha demostrado que tanto el pH bajo como las concentraciones altas de NADH provocan la solubilización de la LDH-5 unida a la fracción particulada del músculo y que esta solubilización se da a pHs y concentraciones de NADH fisiológicas. Esto se ha interpretado como un apoyo más a la teoría aerobia-anaerobia, ya que a concentraciones de oxígeno bajas se produciría un aumento de NADH y un descenso del pH, que solubilizarían la LDH-5, lo que permitiría el desarrollo continuado de la glucolisis anaerobica. En condiciones aerobias, por el contrario, la inactivación de la LDH-5 unida a la fracción particulada evitaría la competencia por el NADH entre la LDH y la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Hultin, 1975; Hirway y Hultin, 1977). Se ha sugerido que la distribución subcelular diferen-

cial de la LDH-1 y la LDH-5 se debería a las diferencias de carga que existen entre las subunidades M y H. Las diferencias de carga neta en la superficie molecular provocarían distintas afinidades con otras macromoléculas y por tanto determinarían la distribución topográfica celular de las isoenzimas (Markert,1975).

b.- LDH 1

Se ha descrito una asociación específica de la LDH-1 con las mitocondrias por métodos de centrifugación diferencial de homogenados tisulares (Agostini et al.,1966). Esta asociación tendría un significado fisiológico, dadas las características cinéticas de esta isoenzima (Kaplan,1968), pero estos resultados se han discutido debido a la posibilidad de redistribución de la LDH durante el fraccionamiento subcelular (Holmes y Masters,1979). Sin embargo, se han encontrado correlaciones funcionales, ya que se ha visto que el lavado de las mitocondrias no evita la oxidación aeróbica del lactato y esta oxidación parece darse en el espacio intermembranoso de las mitocondrias hepáticas, siendo allí iniciada por la LDH-1 (Skilleter y Kun, 1972). Se ha detectado también, recientemente, por técnicas inmunohistoquímicas, la presencia de LDH-1 pero no de LDH-5 en las mitocondrias del hígado de rata (Yamashita et al.,1979). También se ha detectado la presencia de LDH-X en las mitocondrias de espermatogonias y espermatozoides (Montamat y Blanco,1976), pero el uso de técnicas inmunohistoquímicas revela, sin embar

go, una distribución citoplásmica para la LDH-X en el ratón (Hintz y Goldberg,1977).

B.- Localización histoquímica

La aplicación de las técnicas histoquímicas es especialmente interesante para determinar la presencia de distintas enzimas en distintos tipos celulares de un mismo tejido que no son separables macroscópicamente. Tienen además la ventaja de evitar los artefactos producidos por la homogeneización o la centrifugación diferencial. Sin embargo, tienen también sus problemas específicos como la difusión de las enzimas o los reactivos durante la incubación. Jacobsen(1969) ha estudiado en profundidad el revelado de la LDH por el método del lactato-NAD⁺-PMS-NBT, concluyendo que la difusión de la enzima se minimiza seleccionando el fijador adecuado y la de los reactivos se reduce disminuyendo el tiempo de incubación y añadiendo concentraciones de substrato altas (100-200mM). Ha comprobado también que esta reacción es específica para la LDH, por inactivación por calentamiento, piruvato y oxalato. Se ha comprobado también, que la adición de PMS (metasulfato de fenacina) hace que la reacción sea independiente de la NADH₂-reductasa de tetrazolio (Wijhe et al.,1963). Algunos autores han aplicado la incubación en medios gelatinosos para evitar los efectos de difusión (Fahimi y Amarasingham,1964). La importancia del enfoque histoquímico se pone de manifiesto con ejemplos como el de la localización de la LDH en los ovocitos de

mamíferos. La utilización de técnicas bioquímicas había dado como resultado un predominio de LDH-1 en el trofoblasto de muchos mamíferos como el perro, el gato, la vaca, el cerdo, la cabra (Engel y Kreutz,1973) y los roedores en general (Auerbach y Brinster,1967;Rapola y Koskimies,1967). Sin embargo, la combinación de las técnicas histoquímicas con el empleo de inhibidores selectivos de los dos tipos básicos de LDH (piruvato, urea), ha permitido comprobar que en muchos de estos mamíferos y desde luego en el ratón, la isoenzima predominante en el trofoblasto antes de la implantación y en el ovocito, es la LDH-5 y no la LDH-1. La presencia de LDH-1 detectada por técnicas bioquímicas, se debería a la adsorción de esta isoenzima por el embrión a partir los líquidos del oviducto (Masters,1978; Brinkworth y Masters,1978; Holmes y Masters,1979).

a.- Desarrollo embrionario.

Se han realizado pocos trabajos sobre la localización histoquímica de la LDH en los embriones de los poiquiloterms. El grupo más interesado por este problema parece haber sido el del Profesor Boulekbache. Estudiando los primeros estados del desarrollo del huevo de Salmo irideus, han encontrado una distribución en mosaico de la LDH en la blástula y una localización especialmente intensa de la LDH en el botón embrionario y las capas envolvente y profunda durante la epibolia (Rouband et al.,1976). En este último estado, han observado mediante

experimentos de disociación de los blastómeros, que sólomente presentan una actividad LDH importante las células periféricas que desarrollan procesos de fijación o movilidad como lobopodios, lamelipodios y filopodios. La distribución en mosaico en el estado de blástula no fue comprobada al microscopio. Estos autores interpretan estos resultados como correspondientes a una relación entre movilidad celular y actividad LDH intensa. Otros estudios han demostrado en Fundulus heteroclitus que las zonas periféricas del disco embrionario juegan un papel motor en la epibolia (Trinkaus,1973). El estudio durante la organogénesis ha mostrado la localización intensa de la LDH en la corda, el tubo neural, el prosencéfalo y especialmente las células de las vesículas ópticas. Se ha observado que también estos neuroblastos y células retinianas ricos en LDH desarrollan movimientos y migraciones celulares intensas durante su diferenciación. El nudo terminal, que presenta una actividad LDH especialmente intensa, desarrolla movimientos morfogénéticos particularmente intensos y ha sido considerado como homólogo al labio dorsal del blastoporo (Pasteels,1936; Ballard,1973). También se observó una actividad LDH, aunque menos intensa en las regiones periféricas de los somites (Boulekbache et al.,1977).

También se ha estudiado la localización de la actividad total de la LDH durante los primeros estados del desarrollo en Pleurodeles waltlii (Boulekbache y Barja de Quiroga,1981), encontrándose una disposición específica de la enzima alrede-

dor de los núcleos de los blastómeros en el estado de mórula. En la gástrula de esta especie se observó una localización preferente de la actividad en la zona del labio dorsal del blastoporo, las células internas en invaginación y en el epiblasto dorsal incluyendo al neuroblasto. Se ha estudiado en esta especie la diferenciación de las células cartilaginosas en estados posteriores del desarrollo, observándose un aumento de actividad LDH en los condroblastos en el momento en que aumenta mucho la densidad celular, justo antes de la aparición de los primeros condrocitos. Se ha sugerido que el descenso de la tensión de oxígeno local debido a el aumento de densidad celular (Thorogood y Hall, 1976) podría estar relacionado con este aumento de actividad LDH, aunque también se ha propuesto un papel de la LDH en el control de la síntesis de condroitín sulfato a través de la regulación de la tasa $NAD^+/NADH$ (Varughese et al., 1977; Corsín et al., 1979).

b.- Desarrollo larvario en los anfibios.

Se han realizado varios estudios sobre la localización histoquímica de la LDH en el músculo caudal de las larvas de los anfibios. Varios estudios realizados mediante microscopia óptica y electrónica han mostrado que el músculo caudal de las larvas de los anfibios presenta dos tipos de fibra estriada, "roja" y "blanca" (Watanabe, 1969; Grillo et al., 1970; Sasaki, 1973, 74; Watanabe y Sasaki, 1974) que serían equivalentes a las fibras musculares "lenta" y "rápida" de los adultos (Kuffler

y Williams, 1953; Peachey y Huxley, 1962; Page, 1965; Lännergren y Smith, 1966; Franzini, 1970). Estos dos tipos de fibras "rojas, de contracción rítmica" y "blancas, de contracción intensa", tienen una distribución específica de forma que las fibras rojas se colocan en la región periférica del músculo y las fibras blancas en la zona interna. De ahí su nombre de fibras p.m. (periféricas) y fibras i.m. (internas). Las fibras periféricas se disponen inmediatamente por debajo de las células pigmentarias, son de diametro pequeño y ricas en sarcoplasma y mitocondrias. Las fibras internas se colocan por debajo de las fibras periféricas, son más gruesas que éstas y tienen menor cantidad de sarcoplasma y de mitocondrias (Sasaki, 1973). En Rana catesbeiana se ha descrito también la existencia de fibras rojas y blancas en el músculo interhioideo. Las fibras rojas, mediante contracción rítmica, provocarían el bombeo bucal de agua, mientras que las blancas expelerían detritus del sistema de irrigación (Gradwell y Walcott, 1970).

La localización histoquímica de la LDH al microscopio óp-tico y electrónico en el músculo caudal de Rana castebeiana, Rana japónica y Xenopus laevis durante la vida larvaria ha mos-trado que: las fibras periféricas presentan una actividad LDH mucho más alta que las fibras internas; las fibras periféricas son más ricas en subunidades H que las fibras internas; la porción terminal de la cola sólo presenta fibras periféricas más ricas en subunidades H; conforme avanza el desarrollo hay un progresivo aumento de subunidades M, especialmente en la

región terminal de la cola; sigue existiendo actividad LDH incluso en el clímax; al microscopio electrónico, la LDH se localiza en la membrana celular, en vesículas pinocitóticas, en el sarcoplasma, en las mitocondrias y en los túbulos T de las tríadas (Sasaki,1977,1979). En el músculo caudal de Discoglossus pictus se ha encontrado también un porcentaje de subunidades H mucho mayor en la porción distal que en el resto de la cola, y un aumento de subunidades M conforme el desarrollo se va acercando al clímax metamórfico (Alonso et al.,1976). La correlación de las subunidades M con las fibras musculares "rápidas" y de las subunidades H con las fibras musculares "lentas y rítmicas" se ha establecido también en los peces (Odense et al.,1978; Hochachka,1980) y en los mamíferos (Messelt y Blix,1976).

c.- Tejidos adultos

Se ha usado también la combinación de las técnicas histoquímicas con las inmunológicas o con el uso de inhibidores selectivos, para localizar diferencialmente a la LDH-1 y la LDH-5 en los tejidos. Así, se ha podido observar que en el riñón de la rata, las regiones corticales, que tienen un metabolismo predominantemente oxidativo (Lee,1964), presentan un predominio de subunidades H, mientras que las subunidades M son las más abundantes en la médula renal que tiene un metabolismo glucolítico mayor (Kean et al.,1961), (Fine et al.,1963; Smith y Kissane,1963; McMillan,1967; Jacobsen,1969). En el hígado

de la rata y la vaca, se ha podido localizar a la LDH-5 en una zona de citoplasma amorfo que podría corresponder a la región rica en glucógeno, mientras que la LDH-1 aparece en el citoplasma amorfo cercano a la membrana celular en la zona de los canalículos biliares y en las mitocondrias, (Tsygankov et al., 1971; Ito et al., 1973; Yamashita et al., 1979). También se ha descrito la presencia de ambas isoenzimas en la región nuclear (Agostini et al., 1966; Pokrovsky y Korvinikov, 1969).

OBJETIVOS

El problema de la aclimatación a la tensión de oxígeno ambiente ha sido estudiado en los anfibios en cuanto a muchas compensaciones fisiológicas. El caso de la aclimatación a nivel molecular, concretamente con referencia a la enzima clave de la glucólisis, la lactato deshidrogenasa, no ha sido prácticamente abordado en los anfibios y dista de estar clarificado incluso en los llamados vertebrados superiores. Ya que las larvas de los anfibios debido a su hábitat dulceacuícola, se ven con frecuencia sometidos a condiciones de hipoxia e incluso de hiperoxia, nos ha parecido muy interesante estudiar en Discoglossus pictus:

- 1º- El control y expresión génica del polimorfismo LDH previamente observado, tanto por su interés intrínseco, como para su segregación con objeto del estudio posterior en las isoenzimas LDH.
- 2º- La distribución de frecuencias, la movilidad electroforética, la actividad de las isoenzimas y sus propiedades cinéticas, en las distintas variantes polimórficas, para aportar datos sobre su posible significado fisiológico.
- 3º- El efecto de la tensión de oxígeno sobre el consumo de oxígeno, el crecimiento, el comportamiento y la ultraestructura celular en las larvas.

- 4°- El efecto de la aclimatación a la tensión de oxígeno ambiente sobre el sistema isoenzimático de la LDH de los tejidos larvarios.
- 5°- Las variaciones en las actividades total y específica de la LDH durante todo el desarrollo.
- 6°- La localización histoquímica de la LDH en los primeros estados embrionarios y el efecto sobre el desarrollo de la inhibición por el oxamato sódico.

MATERIAL Y METODOS

I - MATERIALES

1.- Productos.-

- Aceite de columnas de Ames.
- Acido acético de Probus.
- Acido clorhídrico de Merck.
- Acido fosfórico de Probus.
- Acido oxámico de Serva.
- Acrilamida de Canalco y BDH Lb. reagents.
- Albúmina humana de Hubber.
- Alumbre de potasa de Probus.
- Amarillo naftol de Probus.
- Benceno de Panreac.
- Bisacrilamida de Canalco.
- Butanol de Panreac.
- Cacodilato sódico de Prolabo.
- Carbonato sódico de Merck.
- Carmín de Merck.
- Cloruro cálcico de Probus.
- Cloruro de mercurio de Probus.
- Dinucleótido de adenina y nocotinamida oxidado (NAD^+) de Merck.
- B-dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido ($\text{NADH} + \text{H}^+$), sal disódica, grado II, de Boehringer.
- Etanol de Panreac.
- Formaldehido de Probus.
- Fosfato bipotásico de Probus.

- Fosfato monopotásico de Probus.
- Hidróxido sódico de Merck.
- Glicocola de Canalco.
- Glutaraldehido de Canalco.
- Gonadotropina coriónica humana (GCH), Pregnil de Organon y Profasi de Farma-Lepori.
- D,L-lactato sódico, grado DL-V, de Sigma.
- Metosulfato de fenazina (PMS) de Sigma.
- MS-222 (etil-m-aminobenzoato metanosulfonato) de Sandoz.
- Nitrato de Cobalto de Merck.
- Nitroazul de tetrazolio-Cl (NBT) de Serva,
- Nitrógeno- R. de S.E.O..
- Oxígeno seco de S.E.O.
- Persulfato amónico de Serva.
- Piruvato sódico, tipo II, de Sigma.
- Reactivo de Folin-Ciocalteau de Panreac.
- Sacarosa de Merck.
- Sulfato de Cobre de Probus.
- Tartrato sódico-potásico de Merck.
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina) de Canalco.
- Tetraoxido de osmio de Serva.
- Tolueno de Panreac.
- Tris (2-amino-2 hidroximetil- 1,3-propanodiol) de Canalco.

2.- Aparatos.-

- Báscula de Precisión Sauter 404.
- Centrífuga MSE 01491 A.

- Compresores de aire RENA 100 y 101.
- Colorímetro Spectronic 20 BAUSH y LOMB.
- Cubetas de electroforesis de disco Shandon.
- Densitómetro Chromoscan de Joyce-Loebl 400.
- Electrodo de oxígeno EIL -1521.
- Espectrofotómetro Beckman DB-G 152704 con inscriptor VOM 5E de Baush y Lomb 37-01-06.
- Fuente de alimentación para electroforesis Vokam SAE 2761 Shandon.
- Incubador Dubnoff PS,GCA, 16 A3-9.
- Lupa binocular PZO, Nr 9030.
- Medidor de oxígeno EIL 1520.
- Microtomo E.COGIT et. Cie. 595.
- Microscopio electrónico JEOL 100-CX.
- Termostatzador con agitación B. Braun 36546.
- Ultramicrotomo LKB 480-1.

3.- Animales de experimentación.-

A.- Animales adultos.-

Todos los experimentos se han realizado en la especie Discoglossus pictus (Otth.) variedad pictus conocido comunmente como "sapillo pintojo". Pertenece a la clase de los Anfibios, Orden Euanuros, suborden Opistocélidos, familia de los Discoglósidos. El género Discoglossus tiene distribución mediterránea, encontrándose en la Península Ibérica, el litoral Francés, Palestina, Marruecos, Argelia, Tu

nez, Sicilia, Córcega y Malta.

En un principio, sólo una especie, pictus (con dos subespecies) estaba incluída en el género Discoglossus. Mendelssohn y Steinitz (1943) citan una nueva especie con la denominación de Discoglossus nigriventris que se da en Palestina. Años mas tarde Knoepffler (1961) eleva la hasta entonces subespecie sardus, oriunda de Córcega y Cerdeña a la categoría de especie. Según este autor, el género Discoglossus incluiría tres especies: pictus que sería la de distribución más amplia; sardus sólo propia de Córcega y Cerdeña e islas contiguas; nigriventris cuya distribución se limita a una pequeña localidad en Palestina.

La especie pictus fue descrita en 1837 por Otth. tomando como muestra ejemplares procedentes de Sicilia que se conservaron en el Museo de Viena. D.pictus presenta una coloración variable. Camerano (1883) fue el primer autor en distinguir las dos variedades existentes: D.pictus var. vittata (variedad a bandas) y D.pictus var. ocellata (var. a manchas). Las frecuencias relativas de ambas variedades varían según las zonas. Lantz (1947) describe una ausencia total de la variedad a bandas en Córcega y Cerdeña. El trabajo de Knoepffler (1961) coincide en el hecho de que todos los especímenes de esas regiones son siempre de la variedad a manchas. Los estudios realizados por Palcich (1957) en la región de Palermo y por Reverberi (1964) en Sicilia muestran una distribución del 93-95% de variedad

a manchas y 5-7% de variedad a bandas en las zonas citadas. Nosotros hemos encontrado una distribución menor del 5% de variedad a bandas en los especímenes capturados en la región de Madrid. No se han encontrado diferencias en cuanto a la frecuencia de ambas pigmentaciones al comparar machos y hembras.

En un principio se pensó que las dos coloraciones se debían a efectos ambientales. Sin embargo el estudio genético por medio de cruzamientos realizado en primer lugar por Lantz (1947) y Gallien (1948) y confirmado después más extensamente por Reverberi (1964) llevó a la conclusión de que la pigmentación de la piel en Discoglossus pictus estaba controlada por un gen dialélico mendeliano. La variedad menos frecuente corresponde curiosamente al gen dominante mientras que los individuos a manchas serían recesivos y homocigotos para el color. Esta situación genética fue confirmada por Alonso-Bedate (1960) haciendo transplantes recíprocos de fragmentos de las crestas neurales (que son las responsables del tipo de coloración) entre las dos variedades.

Debido a su mucha mayor frecuencia y a su carácter homocigoto para la coloración, hemos realizado todos los trabajos experimentales con especímenes de la variedad a manchas capturados en Madrid. Se utilizaron dos zonas de captura referidas como : zona A (Huerta del Obispo) y Zona B (Parque del Oeste). Ambas zonas presentan poblaciones de tamaño pequeño y se encuentran aisladas del exterior por

barreras artificiales.

Los individuos adultos pueden tener una longitud variable, entre 5 y 8 centímetros siendo generalmente mayor el tamaño del macho. La cabeza es puntiaguda presentando un triángulo amarillento característico en su parte superior. La pupila es triangular con un vértice hacia abajo. La boca presenta dientes vomerianos. La lengua tiene forma de disco. Los adultos tienen costillas, vértebra sacra libre y cintura pectoral arcífera. Los machos presentan un ureter secundario, independiente del canal de Wolf. (Grassé, 1976).

Los machos alcanzan la madurez sexual a los tres o cuatro años, presentando excrecencias de color negro sobre los dedos 3° y 4° y en la barbilla durante la época de celo. En este período toda la piel se queratiniza fuertemente haciéndose más rugosa y seca. Estas modificaciones se producen después de una muda particular calificada de sexual. Una nueva muda después de la reproducción devuelve el tegumento a su estado anterior. Los acoplamientos y puestas se repiten hasta seis veces en una misma estación de reproducción. La hembra pone entre 300 y 500 huevos por puesta. (Grassé, 1976).

Se trata de una especie típicamente acuática que frecuenta los estanques, fangales, pantanos, arroyos y manantiales sin alejarse nunca de los cursos de agua. Cuando la temperatura desciende por debajo de 9°C se esconden ba

jo las piedras, hendiduras de las rocas o incluso enterrados en la tierra bajo el mantillo verde donde pasan la estación fría. No se puede hablar de hibernación en sentido estricto en esta especie ya que se han encontrado restos de comida, incluso grandes oligoquetos completos, en el tubo digestivo de animales recogidos en época invernal. Se nutren de Culícidos, Dípteros, Coleópteros, Lepidópteros y son a su vez depredados por Mamíferos, Aves y Serpientes (Natrix, Coluber). Sus principales parásitos son los Hirudineos en general, Nematotaenia dispar (Cestodo), Distomum ranae (trematodo) y Cosmocerca ornata (Nematodo). Viven desde el nivel del mar hasta 2.250 metros de altura. En estado libre viven unos 15 años. El número de cromosomas es de 14 pares, siendo 20 metacéntricos y 8 acrocéntricos (Salvat, 1968).

Los animales adultos, después de su captura se guardaron en cajas de plástico a $8 \pm 3^{\circ}\text{C}$ de temperatura y en ayunas hasta el momento de su utilización. Para la obtención de puestas se inyectaron entre 300 y 400 unidades (según la época del año) de hormona gonadotrópica coriónica humana (HGC) tanto a los machos como a las hembras, uno o dos días después de la captura. Los animales se inyectaron siempre por la tarde. La inyección alcanza el saco linfático ventral a través del músculo sartorio, para evitar el retroceso del líquido con la retirada de la aguja. Se dejan las parejas cerca del calor (25°C aproximadamente) durante la noche, obteniéndose las puestas al día

siguiente por la mañana. La H.G.C. humana induce la cópula así como la maduración de los huevos en la hembra. La hormona necesita la existencia de la capa de células foliculares para ejercer su acción sobre los huevos en maduración. Trabajos de C. Otero y otros (1978) en la especie Discoglossus pictus, han mostrado que la H.G.C. humana provoca la incorporación de nutrientes exógenos, especialmente aminoácidos en el interior de los folículos. _ Este efecto, aunque correlacionado, no parece ser necesario para la maduración del oocito.

Para la realización de cruzamientos fue necesaria la identificación previa del fenotipo LDH de los padres. Con este fin, se extirpó una pequeña cantidad de músculo gastrocnemio a machos y hembras previa anestesia con eter etílico. El músculo así extraído se utilizó para la identificación del fenotipo LDH como veremos más adelante. Los animales se recuperan totalmente de la anestesia al cabo de unas dos horas y pueden ser utilizados al día siguiente para la obtención de puestas.

En el caso de los experimentos realizados sobre músculo sartorio, corazón y riñón de animales adultos para el estudio de la cinética de las isoenzimas LDH, la perma--nencia máxima de los animales en el laboratorio no superó las dos semanas en frío y ayuno hasta su utilización.

B.- Desarrollo embrionario.-

Los huevos recién puestos por la hembra son esféricos y de un tamaño aproximado de 1 mm. Al contacto con el agua las membranas gelatinosas de los huevos se hinchan y alcanzan un diámetro de unos 2 ó 3 mm. Los huevos no se aglutinan entre sí, y son emitidos a intervalos en grupos de 20 a 50 y caen al fondo. El polo animal presenta una pigmentación pardooscura. El polo vegetativo, donde se encuentra el vitelo en mayor abundancia, ocupa el tercio o cuarto inferior y es de color blanco grisáceo.

Los huevos de *Discoglossus* recién puestos son esféricos a excepción de una hendidura pronunciada que aparece en el polo animal en la cual se acumulan los espermatozoides. Esta zona es el lugar de penetración del espermatozoide, la zona de activación. Esta activación es fácilmente detectable por la desaparición de la hendidura superior a consecuencia de la misma, de modo que el huevo activado es totalmente esférico. A consecuencia de la activación se produce también la rotación y equilibración del huevo al levantarse la membrana de fecundación, de forma que los huevos activados presentan el polo animal pigmentado siempre hacia la parte superior.

El desarrollo embrionario en *D. pictus* es muy rápido, lo que juntamente con su respuesta a la GCH convierte a esta especie en un buen material de trabajo para el tipo de estudios que hemos realizado. La velocidad de desarro-

llo depende de la temperatura, completandose la fase embrionaria en dos semanas a partir de la puesta a una temperatura de 22°C.

Para la determinación de los estados del desarrollo embrionario hemos utilizado la tabla de Gallien y Houillon (1951) para D.pictus pictus. Esta tabla resume el desarrollo embrionario en 32 estados designados con números arábigos y abarca desde la puesta hasta el fin de la formación del espiráculo. La segmentación abarca hasta el estado 8 y se completa en una 15 horas. La gastrulación cubre los estados desde el 8 al 11 durando otras 24 horas. La neurulación empieza en el estado 12. Sobre la neurula aparecen ya los primeros somites en la zona posterior y el embrión presenta cilios vibrátiles. Esta fase se completa en el estado 16. La eclosión ocurre en el estado 19. Entre los estados 20 y 25 se completa la circulación sanguínea.

Entre los estados 26 y 32 comienzan los movimientos natatorios, se desarrolla el tubo digestivo, el opérculo recubre las branquias externas y finalmente aparece el espiráculo que es medio-ventral. A partir del estado 32 el desarrollo embrionario se considera terminado y la joven larva, que mide unos 9mm. y tiene unos 15 días de edad, comienza a alimentarse.

La descripción de los estados del desarrollo embrionario utilizados en los distintos experimentos del pre-

sente trabajo se da brevemente a continuación. Los tiempos de desarrollo son medias de los tiempos observados en las diferentes puestas.

- Estado 0.- 0 horas. Huevos sin activar. Se recogen de la porción distal del oviducto.
- Estado 6.- 8 horas. Huevo en segmentación. Estado de mó rula entre 64 y 128 células.
- Estado 8.- 15 horas. Fín de la segmentación. Inicio del labio dorsal. Comienza la invaginación y movimiento de células del cordomesodermo dorsal hacia el interior de la futura gástrula.
- Estado 10.- 24 horas. Botón vitelino. Labios dorsal y ventral del blastoporo unidos. Punto medio del proceso de gastrulación.
- Estado 14.- 44 horas. Punto medio del proceso de neurulación. Crestas medulares convergentes en la región posterior.
- Estado 16.- 55 horas. Fín de la neurulación. Aparecen los primeros cinco somites. Si se separa de la ganga y el corion, el embrión es capaz de desplazarse sobre una superficie lisa gracias a sus cilios vibrátiles.
- Estado 19.- 3 días. Respuesta a la estimulación mecánica. Eclosión. 6-7 somites.
- Estado 20.- 3 días. 13-15 somites.

- Estado 21.- 3,5 días. Comienza el latido del corazón. Se observa ventralmente el órgano adhesivo.
- Estado 23.- 4 días. Ya se ha producido la eclosión y posee un órgano adhesivo en la región ventral. El corazón ya late y es característica de este estado la circulación en los dos pares de branquias externas.
- Estado 27.- 6 días. El embrión posee las branquias externas con inicio de opérculo y comienza a nadar libremente. Tubo digestivo en desarrollo.
- Estado 30.- 10 días. Las branquias externas están casi cubiertas por el opérculo impar. Se ven dentículos córneos sobre los repliegues de la boca. A los lados se observan bandas de cromatóforos.

C.- Desarrollo larvario.

El desarrollo larvario abarca desde el comienzo de la alimentación, cuando el renacuajo mide unos 9 mm. hasta el fin de la metamorfosis, al término de la cual los jóvenes miden unos 15 mm. Este proceso dura entre 35 y 40 días aproximadamente. Al no existir tabla del desarrollo larvario para Discoglossus pictus, de entre todas las demás tablas existentes para otros anuros, hemos elegido la referente a Rana pipiens (Taylor y Kollros 1946). El criterio de elección se ha basado en la relativa similitud de ambos desarrollos, y en la gran difusión de la tabla de Taylor. El hecho de que los estados se refieran en ella

con números romanos, evita posibles confusiones con los estados del desarrollo embrionario en las referencias del texto. Esta tabla divide el desarrollo en tres fases fundamentales.

La primera fase o Premetamorfosis abarca los estados desde el I al X y dura 20 ó 25 días. Se trata fundamentalmente de una fase de crecimiento durante la cual comienzan a aparecer las extremidades posteriores que tienen forma de paleta.

La segunda fase es la Prometamorfosis. En esta fase continúa el crecimiento de forma que el animal llega a medir unos 38 mm. Esta fase representa una preparación para la metamorfosis. Posiblemente muchos de los cambios bioquímicos necesarios para la realización de la metamorfosis se produzcan en las etapas finales de esta fase. Abarca desde el estado XI al XVIII y dura unos 10 días. Las 4 extremidades con sus dedos se forman completamente. Tanto durante la Pre como durante la Prometamorfosis los renacuajos son alimentados con espinacas cocidas, dado el carácter eminentemente hervívoro de las larvas. Es de notar sin embargo, un cierto grado de canibalismo sobre los individuos más pequeños y menos desarrollados. Este tipo de fenómeno se ha procurado evitar manteniendo a los animales separados en grupos lo más sincrónicos posibles y con aporte de comida en exceso, ya que experimentos realizados en nuestro laboratorio apuntan en el sentido de una

influencia diferencial del tipo de dieta (carbohidratos-lípido + proteína) sobre las isoenzimas LDH. La tercera y última fase del desarrollo larvario es el clímax metamórfico y dura una semana aproximadamente, desde el estado XIX al XXV. El animal deja de comer y se dan grandes transformaciones metabólicas que van a permitir el paso de la vida acuática a la vida aérea. Salen al exterior los miembros anteriores, se flexionan los posteriores, se alarga la boca hasta detrás de los ojos, se produce la regresión de la cola, etc. Entre los cambios fisiológicos son de destacar cambios en la movilidad electroforética de la hemoglobina, y el paso de la excreción del nitrógeno en forma de amoníaco a una excreción ureotélica.

La descripción de los estados del desarrollo utilizados se detalla brevemente a continuación:

- Estado I.- Este estado marca el inicio de la vida larvaria. El renacuajo, ya con el ano abierto, comienza a comer. Empiezan a asomar al exterior los esbozos de las extremidades posteriores.
- Estado III.- Los esbozos de las extremidades posteriores son el doble de largos que de anchos. El animal pasa un largo período de tiempo en este estado, entre 7 y 12 días. Durante este tiempo el único cambio observable es el crecimiento del animal. El hígado está ya bien diferenciado y presenta vesícula biliar. La longitud en _

este estado oscila entre 1,5 y 20 mm.

- Estado IV.- Este estado se distingue del anterior por el tamaño de las extremidades posteriores y por la aparición en ellas de una curvatura que representa el esbozo del pié.
- Estado VII.- El pié está ahora bien delimitado y se distingue del resto de la extremidad por un estrechamiento. Aparece un esbozo del 2° dedo.
- Estado XI.- Inicio de la prometamorfosis.
- Estado XII.- Aparecen ya los esbozos de los 5 dedos. Extremidad posterior con dos partes separadas por una inflexión.
- Estado XIV.- Comienza la separación entre los diferentes dedos de la extremidad posterior.
- Estado XVI.- Aparecen nudillos que separan las distintas falanges de los dedos.
- Estado XVII-XVIII.- Extremidades posteriores con longitud máxima, divididas en 4 partes, con membrana interdigital. La longitud en este estado es la máxima del desarrollo, pudiendo variar entre 33-38 mm.
- Estado XIX.- La aparición en el exterior de la extremidad anterior derecha marca el inicio del clímax metamórfico. Se doblan las extremidades posteriores de forma que los muslos se colocan ahora perpendicularmente al eje antero-posterior.

- Estado XX.- Aparece la extremidad anterior izquierda. Se inicia la regresión de la cola. La boca comienza a ensancharse lateralmente.
- Estado XXIII.- La boca llega ahora hasta detrás de los ojos. Cola reducida a una quinta parte de su longitud.
- Estado XXV.- Fin del clímax metamórfico. La longitud del animal se ha reducido a unos 10mm., debido a la pérdida de la cola y también a una cierta deshidratación del animal que ahora comienza su vida terrestre.

Durante todo el desarrollo, los animales se mantienen en agua desclorada en cristalizadores de vidrio o plástico. El joven recién metamorfoseado mide unos 10mm, alcanza 20mm a finales del primer año, 30mm al finalizar el segundo y entre 50 y 60mm al final del tercer año. El momento en que alcanzan la madurez sexual varía según las condiciones climáticas y suele alcanzarse al final del tercer año de vida. (Salvat, 1968).

Durante todo el desarrollo larvario los animales se alimentaron con espinacas cocidas. La ingestión de alimento no fué nunca un factor limitante.

II - METODOS

1.- Control de la tensión de oxígeno.-

Para llevar a cabo los experimentos de aclimatación a las distintas concentraciones de oxígeno a largo plazo (15 _

días) se utilizaron cuatro niveles de tensión de oxígeno. Estos niveles fueron:

1) hiperoxia-100 % O_2 (710mmHg de O_2); 2) normoxia-21% O_2 (149,1mm Hg O_2); 3) hipoxia moderada- 12,6% de O_2 (89,5mm Hg O_2) y 4) hipoxia extrema- 5,25% O_2 (37,3 mmHg O_2).

Como en los estados en los que se realizaron los experimentos las larvas poseen tanto branquias como pulmones funcionales, las tensiones de oxígeno arriba citadas se mantuvieron constantes tanto en la fase gaseosa como en la fase líquida. Las larvas se colocaron en recipientes de vidrio de cuatro litros de capacidad. La fase acuosa ocupó un litro y la gaseosa tres litros. Los recipientes poseían tapaderas esmeriladas que facilitaron el cierre hermético con aplicación de silicona entre las superficies en contacto. Estaban provistos de una entrada y una salida de gases. Se utilizaron oxígeno y nitrógeno, gases secos de origen industrial. Se prepararon mezclas gaseosas con ayuda de sendos candalímetros a la salida de una bala de O_2 y otra de N_2 conectadas por un tubo en Y. La fase líquida se equilibró por burbujeo de la mezcla de gas. La fase gaseosa del recipiente se substituyó por la mezcla de gas deseada haciendo pasar esta última por el recipiente durante unos diez minutos a un caudal de 3l/min. Las tensiones finales de oxígeno en ambas fases se comprobaron con un electrodo y medidor de oxígeno antes de cerrar el recipiente. Cada 24-48 horas se abrieron los recipientes para limpiar los deshechos y renovar los medios líquidos.

do y gaseoso. Cada vez que se realizó esta operación se midió la tensión de oxígeno en ambas fases. Las variaciones en tensión de oxígeno al final de cada período de 24-48 horas no fueron nunca superiores a 4mm Hg de oxígeno. Durante todo el período de aclimatación las fases gaseosa y líquida se mantuvieron en equilibrio por burbujeo contínuo de la primera en la segunda introduciendo en el interior de cada recipiente un compresor de aire. Esto evita el descenso agudo de oxígeno en la fase líquida (que se produciría debido al consumo de larvas), ya que a igualdad de tensiones de oxígeno, la cantidad de oxígeno es mucho mayor en el aire que en el agua. El burbujeo se realizó en el interior de un recipiente de plástico, pequeño, dispuesto en la fase líquida. Este recipiente evita la muerte de las larvas que de otro modo se produciría, debido al burbujeo directo. El recipiente posee dos orificios laterales tapados con una red fina de tul que permite el intercambio acuoso pero no el paso de los animales a su interior. El número máximo de larvas por cada recipiente de vidrio no fue nunca mayor de 10.

Los experimentos de aclimatación a las distintas tensiones de oxígeno se realizaron en dos períodos: un periodo de preaclimatación (una semana) y otro de aclimatación a la tensión de oxígeno deseada (dos semanas). En el caso de la hipoxia extrema, durante los primeros siete días (preaclimatación) se descendió la tensión de oxígeno

desde el 21% normal en cuatro fases:

1) 16,8% O_2 (119,3mm Hg O_2); 2) 12,6% O_2 (89,5mm Hg O_2);
3) 8,4% O_2 (59,6mm Hg O_2); 4) 5,25% O_2 (37,3mm Hg O_2). Pa
ra la hipoxia moderada se usaron sólo las fases 1 y 2 pa
ra la preaclimatación. No hubo período de preaclimatación
en el caso de la hiperoxia. Para el ajuste del medidor de
oxígeno se tuvo en cuenta la presión media en Madrid que
se tomo con un valor de 710mm Hg y la presión de vapor de
agua según la temperatura media de cada período experimen
tal.

2.-Consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno se midió según el método de R.S. Pullin
y colaboradores con ciertas modificaciones. Se utilizó un
electrodo con un medidor de oxígeno acoplado. Las larvas
se introdujeron en frascos de vidrio transparente, de igual
forma y tamaño y 300ml de capacidad. Los recipientes se
llenaron de agua a una tensión de oxígeno conocida. El nú
mero de larvas por recipiente fué de tres. Los recipientes
se sumergieron en un incubador que mantuvo la temperatura
a 20°C durante todo el experimento. Se midió la tensión de
oxígeno con el electrodo a los cero y 120 minutos en el ca
so de animales anestesiados. En los animales activos se mi
dió la tensión de oxígeno a los cero y 60 minutos. La con
centración de oxígeno en ml/l se obtuvo por la fórmula:

$$C = p \cdot \frac{A}{760} \quad \text{Hill R.W. (1976)}$$

C= concentración de oxígeno en ml/l

p= tensión de oxígeno en mm Hg

A= coeficiente de absorción del oxígeno en agua.

(31ml/l a 20°C)

El consumo de oxígeno/embrión/hora se obtiene por diferencia. En el caso de la medida de la tasa metabólica basal se anestesiaron las larvas durante toda la experiencia con MS-222 a concentración 1/10.000 en agua desclorada. Se utilizaron los mismos animales que se usaron para determinar la tasa metabólica activa. El peso húmedo se determinó pesando los animales correspondientes a cada recipiente por separado después de secados con papel de filtro. El peso seco se determinó pesando los restos de las larvas después de haber sido sometidas a 70°C durante 48 h. en una estufa, comprobando la pérdida total del agua mediante el método de doble pesada. El consumo de oxígeno se midió siempre en oscuridad.

Para la obtención de los valores que relacionan el consumo de oxígeno (variable dependiente) con la tensión de oxígeno ambiental (variable independiente), se realizaron dos grupos experimentales:

1^{er} Grupo: Tasa metabólica activa medida a 20°C en seis tensiones de oxígeno, 247 mm Hg, 150 mm Hg, 119 mm Hg, 90 mm Hg, 52 mm Hg y 35 mm de Hg de O₂.

2° Grupo: Tasa metabólica basal en larvas anestesiadas con MS-222 medida en seis tensiones de oxígeno, 249 mm Hg, 146 mm Hg, 122 mm Hg, 93 mm Hg, 63 mm Hg y 41 mm Hg.

En ambos casos se hicieron cuatro experimentos por cada tensión de oxígeno, cada uno con tres larvas por frasco. Los valores de tensión de oxígeno expresados arriba son las medias entre las tensiones de oxígeno al inicio y al final de cada experimento en cada subgrupo. En todos los experimentos se utilizó un recipiente extra como control sin larvas para comprobar la ausencia de consumo de O₂ en ausencia de los animales experimentales.

3.- Medida de la actividad relativa de las isoenzimas LDH.

A.- preparación de muestras

Los animales adultos se desmedularon con un alfiler de cabeza gruesa, se disecaron y se extrajeron los órganos para su homogeneización que se realizó en homogeneizadores de vidrio de tipo Pobel. La homogeneización se realizó en una solución tamponada Tris-ClH 0,1M pH 7,4 que contenía sacarosa 0,25 M, a una

concentración de 20mg de tejido por ml de solución tampón en todos los casos.

En el caso de larvas y embriones las concentraciones utilizadas fueron las siguientes:

Estados 0,6,7,10,14,16,23,27 y 30 : 0,1ml/embrión

Estados I,III,IV y VII : 0,5ml/embrión

Estados XII,XIV,XXIII y XXV : 2ml/embrión

Estados XVII,XIX y XX : 3,5ml/embrión

Hígado completo, estados XIV y XXV : 0,15ml/hígado

Músculo caudal, estado XIV : 0,8ml/cola

La homogeneización se realizó en jeringas de insulina de 2ml. Los homogenados se centrifugaron a 2.500xg durante 25 minutos a la temperatura del laboratorio. Después de la centrifugación se separaron los sobrenadantes que se guardaron en frigorífico a 5°C durante cuatro horas hasta la realización de la electroforesis.

B.- preparación de los geles.

Para la separación de las isoenzimas LDH se utilizó electroforesis de disco sobre gel de poliacrilamida según la técnica de Ornstein (1964) y Davis (1964) con algunas modificaciones. Los geles se elaboraron en tubos de vidrio de 75mm con 7mm de diámetro externo y 5mm de diámetro interno. En todos los casos en el gel separador la concentración de bis-acrilamida respecto a la acrilamida total se conservó en el valor de 2,5%. Según trabajos de Fawcett (1966) y Johnson (1978) las concentraciones que dan una mejor separación varían entre el 2 y el 5% de bis-acrilamida respecto al total de acrilamida.

Para obtener los patrones de isoenzimas del músculo caudal de larvas en el estado XIV se utilizaron geles de columna simple con acrilamida al 6,5%. La composición del gel se da a continuación:

- Tris 0,38 M
- ClH 0,06 N
- Temed 1,98 mM (catalizador n°1)
- Acrilamida (monómero) 6,5%
- Bis-acrilamida 0,16%
- Persulfato amónico 3,07 mM (catalizador n°2)
- El pH fue 9,3

Todas estas sustancias se mezclan en un recipiente evi

tando la formación de burbujas. Con ayuda de una jeringa de insulina se depositan 1,2ml de mezcla en cada tubo que se ha cerrado previamente por el extremo inferior con papel de parafina. Los tubos se colocan en una gradilla, verticalmente y en un lugar liso y firme para evitar las vibraciones. Después de depositar la mezcla de polimerización, se añade con cuidado y en la parte superior una capa fina de agua destilada. Esta capa de agua tiene dos funciones fundamentales: 1) Evitar el contacto con el aire, ya que el oxígeno molecular inhibe la polimerización 2) Evitar la formación de un menisco en la cara superior del gel. Se dejan reposar las columnas durante 25 minutos a la luz del día y se obtienen geles de unos 60 mm de longitud.

En todos los demás casos se utilizaron geles dobles. Cada columna lleva un gel superior de poro ancho (2,5% de acrilamida) con 3 mm de longitud y un gel inferior de poro estrecho (7,5% de acrilamida) de 60 mm. El gel superior sirve para igualar el frente de proteínas y el inferior es el gel verdaderamente separador. En el caso del músculo de la cola se omitió el gel superior para obtener electroferogramas más limpios ya que por las características de este tejido se acumula material de arrastre en la parte superior si se usa además el gel de 2,5%. La composición de los geles con 2,5 y 7,5% de acrilamida se da a continuación:

- Gel del 2,5% (superior)
 - Tris 0,38 M
 - ClH 0,06 N
 - Temed 1,98 mM
 - Acrilamida 2,5%
 - Bis-acrilamida 0,625%
 - Persulfato amónico 3,07 mM
 - pH 9,3

- Gel del 7,5%
 - Tris 0,38 M
 - ClH 0,06 N
 - Temed 1,98 mM
 - Acrilamida 7,5%
 - Bis-acrilamida 0,185%
 - Persulfato amónico 3,07mM
 - pH 9,3

El gel del 7,5% se prepara como se describió en el ca
so del de 6,5%. Después de que ha terminado de polimer
rizar el gel se elimina la capa superior de agua, se
termina de secar con tiras de papel de filtro y se dep
positan en cada columna 0,1 ml de la mezcla de polimer
rización del gel de 2,5%. Encima se añade de nuevo,
con cuidado para evitar la mezcla, una capa de agua.
Después de terminada esta segunda polimerización se
elimina la capa superior de agua y el gel está dispuese

to para la electroforesis, la cual se realiza después de una o dos horas.

C.- Electroforesis.

Los geles dentro de sus tubos de vidrio correspondientes se montan en una o dos cubetas según el número de electroforesis a realizar (cada cubeta puede alojar un máximo de ocho columnas). Las cubetas se conectan a una fuente de alimentación con capacidad de hasta 400 voltios y 80 mA. Los electrodos son de platino, el inferior corresponde al ánodo y el superior al cátodo. Las cámaras de los electrodos se llenan con la solución tampón:

-Tris 0,01 M

-Glicocola 0,076 M

-pH 8,3

Después de añadir este tampón y a través del mismo se dejan caer sobre cada gel por decantación 20 µl de muestra con ayuda de pipetas graduadas. Para el desarrollo de la electroforesis las cubetas se introducen en un refrigerador a 4-8°C. Cuando los geles utilizados son del 6,5% la electroforesis se desarrolla a 3mA/tubo como intensidad constante y durante 90 minutos. Cuando se utilizan columnas dobles (2,5% y 7,5%)

se aplica 1mA/tubo durante los primeros 30 min y 3mA/tubo durante los restantes 90 min. Al comienzo de la electroforesis con intensidad de 3mA/tubo, la diferencia de potencial es de 150 voltios. Esta diferencia de potencial va aumentando con el desarrollo de la electroforesis llegando al final del período de dos horas a unos 250 V.

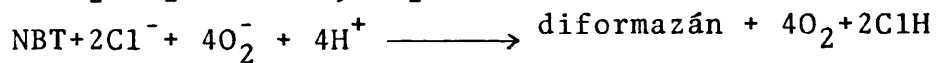
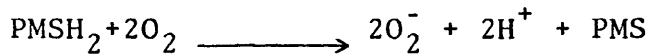
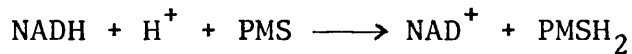
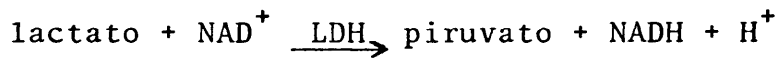
Gracias a la introducción de las cubetas en un refrigerador, la temperatura en las cámaras de los electrodos nunca fue superior a 25°C al final de la electroforesis.

Al finalizar la electroforesis se sacan los geles de las cámaras y se extraen del interior de los tubos de vidrio. Esta operación se realiza en medio acuoso con ayuda de un fiel de aguja y en caso necesario presionando con el émbolo de una jeringa de plástico del tamaño adecuado.

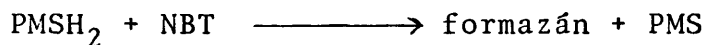
El revelado de las bandas de actividad de las isoenzimas se realizó por incubación en oscuridad, a 37°C en un medio con NAD^+ , lactato, metasulfato de fenazina (PMS) y nitroazul de tetrazolio (NBT).

En estas condiciones y en un medio aerobio como el nuestro se dan, según Nishikimi y col. (1972) las si--

guientes reacciones:



Sólo en condiciones anaerobias el PMSH_2 puede ceder sus electrones al NBT directamente (Ponti, 1978):



El color azul violáceo del formazán que precipita en el gel nos revela las zonas con actividad LDH. Las concentraciones utilizadas en la mezcla de incubación fueron:

- Tampón Tris-ClH 23,7 mM, pH7,0
- Lactato- Na^+ 0,19 M
- NAD^+ 1,19 mM
- PMS 0,08 mM
- NBT 0,66 mM

Debido a las diferencias en el grado de inhibición por substrato en las isoenzimas ricas en subunidades de tipo H o de tipo M, la concentración de lactato utilizada puede alterar significativamente el porcen

taje de isoenzimas. Se han utilizado para cuantificar las isoenzimas LDH, concentraciones de lactato muy dispares según los autores, desde concentraciones tan bajas como 0,018 M (Fritz y col.1970) hasta valores tan altos como 0,5M (Mckenzie 1974). Springell (1976), sometió suero de toro a distintas concentraciones de lactato obteniendo un predominio de la LDH1 en lactato 0,017M y un predominio de LDH5 en las mismas muestras usando lactato 0,27M. La concentración 0,14M resultaba intermedia. Este trabajo junto con el realizado por el Dr. de Costa (1978) en Discoglossus pictus, muestra que la concentración utilizada por nosotros se puede calificar de intermedia no favoreciendo demasiado a ninguna de las dos isoenzimas extremas.

Al terminar la incubación se detiene rápidamente la reacción pasando los tubos a un recipiente con hielo, eliminando el medio de incubación y lavando dos veces con agua desionizada fría. El agua se substituye a continuación por ácido acético al 7,5% que sirve como medio de conservación y almacenaje en obscuridad. La cuantificación de las bandas obtenidas se realizó en un densitómetro entre uno y tres días después de realizada la incubación.

Para obtener el porcentaje de actividad relativa de cada isoenzima se dividió el área de cada pico obteni

do en el densitómetro por la suma total de las áreas de los cinco picos. Las áreas se midieron con un integrador automático. La suma total se tomó como el 100% de actividad.

El porcentaje subunidades H y M se calculó en base al número de subunidades de cada tipo en cada isoenzima de la siguiente forma:

$$\% \text{ Subunidades M} = \frac{4(\% \text{LDH5}) + 3(\% \text{LDH4}) + 2(\% \text{LDH3}) + (\% \text{LDH2})}{4}$$

$$\% \text{ Subunidades H} = 100 - \% \text{ subunidades M}$$

D.- Cinética de las isoenzimas LDH

Los experimentos de cinética de las isoenzimas se realizaron utilizando las diferencias de sensibilidad térmica entre las mismas.

En Discoglossus pictus la exposición de sobrenadantes durante 15 min. a 70°C provoca la desaparición de la actividad de las isoenzimas menos abundantes en el extracto (J. de Costa 1973). En nuestro caso el método utilizado fue el siguiente:

Se capturaron 15 animales procedentes de la zona A (abundante en fenotipos LDH-rápido) y 19 animales de

la zona B (abundante en fenotipos LDH-lento). De los 15 animales procedentes de la zona A, ocho elegidos al azar sufrieron una extirpación de unos 20 mg de músculo gastrocnémico previa anestesia con eter. Los extractos se trataron como en el apartado anterior para la obtención del patrón de isoenzimas LDH. De los ocho animales, dos presentaron fenotipo LDH intermedio y seis fenotipo LDH-rápido. Cinco de estos seis animales se utilizaron para la determinación de la cinética de las isoenzimas LDH 1 (corazón+riñón) y LDH5-rápida (músculo sartorio).

De los 19 animales procedentes de la zona B, 16 fueron utilizados para la preparación de extractos de músculo gastrocnémico que fueron sometidos a su vez a electroforesis. Resultó la siguiente distribución: 2 animales poseían LDH de fenotipo rápido, 9 fenotipo LDH intermedio y 5 fenotipo LDH lento. Estos cinco animales de fenotipo lento se utilizaron para la medida de la cinética de la LDH-5 lenta (músculo sartorio).

Se utilizaron mezclas de extractos de corazón y riñón para el estudio de la cinética de la LDH 1 y extractos de músculo sartorio para los dos tipos de LDH 5. La concentración en los homogenados fue siempre de 20 mg de tejido por ml de Tris-sacarosa.

Todos los homogenados se centrifugaron a 2.500 g durante 25 min. y después se incubaron a 70°C durante 15 min. A continuación se sometieron a una segunda centrifugación a 2.500 g durante 25 min. Los sobrenadantes se dividieron en dos partes. La primera alícuota se utilizó para el desarrollo de una electroforesis. Los patrones isoenzimáticos mostraron una sólo banda (en lugar de cinco). Esta banda fue la LDH 5-lenta o la LDH5- rápida en el músculo dependiendo del fenotipo del animal de origen, y la LDH1 en el caso del corazón+riñón. Las bandas no mostraron variaciones en la movilidad electroforética después del calentamiento respecto a los patrones normales de cada tipo.

Después de comprobar la existencia de una sólo banda (LDH1 ó LDH5) detectable en la electroforesis, la otra alícuota separada de cada sobrenadante se utilizó para la medida de la actividad total y específica de la LDH en siete concentraciones distintas de sustrato (piruvato). Estas concentraciones fueron: 0,034mM; 0,085mM; 0,17mM; 0,34mM; 0,68mM; 1,36mM y 2,72mM. La K_m y la V_{max} se obtuvieron por la representación de Lineweaver-Burk de dobles recíprocos. La cantidad de proteína se midió por el método de Lowry y otros (1951).

4.- Medida de las actividades total y específica LDH

La medida de la actividad LDH puede hacerse, bien desarrollando la reacción en el sentido piruvato \longrightarrow lactato (funcionando la enzima como piruvato reductasa) o bien en el sentido lactato \longrightarrow piruvato (funcionando como lactato deshidrogenasa en sentido estricto). En los últimos años, debido al aumento del uso de equipos automatizados, se ha extendido la elección del lactato como sustrato de la reacción (Howel 1979). Sin embargo, el desarrollo de la reacción en el sentido piruvato \longrightarrow lactato presenta tres ventajas importantes: 1) Se obtiene un mayor cambio en absorbancia por unidad de tiempo, lo cual permite una mayor exactitud en la lectura espectrofotométrica 2) Son necesarias concentraciones muchos menores de reactivos 3) Las soluciones se preparan con reactivos sólidos y además mucho más estables. Al desarrollo de la reacción en este sentido se le ha achacado el posible efecto de inhibición de la enzima por el NADH. Se ha visto sin embargo, (Howell 1979) que el uso de concentraciones de NADH inferiores o iguales a 0,5mM no provoca inhibición de la enzima. Debido a todo esto, hemos elegido el sentido piruvato \longrightarrow lactato para medir la actividad de la LDH.

Para medir la actividad de cualquier enzima es conveniente

te utilizar concentraciones de sustrato y cofactor que sean saturantes así como el pH óptimo en cada caso. Esto permite una comparación de los resultados obtenidos en distintos laboratorios. Para determinar estos tres parámetros en el caso concreto de Discoglossus pictus, hemos utilizado extractos de larvas en el estado XIX. En primer lugar se midió la actividad de la enzima en un extracto con seis embriones en presencia de siete concentraciones distintas de piruvato, NADH $2,13 \times 10^{-4} \text{M}$ y pH 7,0. Los resultados, que aparecen en la tabla 1-A muestran que la concentración de sustrato saturante fue de 1,36mM. A continuación se preparó otro extracto con otras seis larvas en el mismo estado midiéndose la actividad en siete concentraciones de NADH distintas usando piruvato 1,36mM y pH 7,0. La concentración de NADH saturante resultó ser 0,213 mM (Tabla 1-B). Por último, se midió en un tercer extracto preparado de la misma forma, la actividad LDH con variaciones de pH desde 5,5 hasta 8,9 usando piruvato 1,36mM y NADH 0,213 mM. Como se aprecia en la tabla 1-C el pH óptimo fue 7,0. En los tres casos cada valor de la tabla es la media de dos medidas consecutivas.

Estos tres parámetros, piruvato 1,36mM, NADH 0,21mM y pH 7,0, así como 20°C, fueron las condiciones utilizadas en todas las medidas de la actividad LDH.

TABLA I

ACTIVIDAD TOTAL DE LA LDH EN LARVAS ANTE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PIRUVATO, NADH Y pH. 20°C. ESTADO XIX.

A		B		C	
1		2			
piruvato	ACT.LDH	NADH	ACT.LDH	pH	ACT.LDH
0,034	6,8	0,16	9,8	5,5	19,9
0,051	9,3	0,28	14,9	6,0	21,9
0,085	13,3	0,94	28,9	6,8	24,4
0,17	17,8	1,24	31,2	7,0	26,6
0,34	25,4	1,57	33,8	7,2	21,8
0,68	26,2	2,13	34,7	7,4	18,9
1,36	27,2	3,35	22,5	7,6	16,8
2,72	19,8			7,8	13,4
				9,0	10,4

- La actividad LDH se expresa en μ moles de NADH oxidados por minuto y por larva. Cada dato de actividad es la media de dos medidas consecutivas sobre cada extracto.

- A,B y C son tres extractos diferentes con 6 larvas cada uno.

A: NADH $2,13 \times 10^{-4}$ M y pH 7,0; B: piruvato 1,36mM y pH 7,0; C: piruvato 1,36mM y NADH $2,13 \times 10^{-4}$ M.

- 1) El piruvato se expresa en concentraciones 10^{-3} M.

- 2) NADH en concentraciones 10^{-4} M.

La actividad total LDH se midió por el método de Bergmeyer et al. (1965) con ciertas modificaciones. El método se basa en la medida de la desaparición de la absorvancia del NADH a 340nm conforme avanza la reacción. Por cada mol de NADH⁺ consumido, un mol de piruvato se transforma en un mol de lactato.

La preparación de homogenados y la centrifugación se realizó como se describe en el apartado 3-A. La reacción se realizó en los sobrenadantes en piruvato 1,36mM y NADH 0,21mM en tampón fosfato 58mM (fosfato bipotásico 50mM y fosfato monopotásico 8mM) a pH 7,0 y 20°C. La reacción se realizó en cubetas de cuarzo de 3 ml de volúmen y 1cm de paso de luz. El espectrofotómetro se ajustó a una longitud de onda de 340nm. Se midió la variación de la transmitancia con un inscriptor acoplado durante 5 min. Los datos de la transmitancia se tomaron cada minuto, se transformaron a absorvancia y se utilizaron para el cálculo del incremento medio de densidad óptica por minuto (\overline{ADO}). La actividad total de la enzima se expresó en μ moles de NADH oxidados por minuto por embrión y por centímetro de paso de luz de la cubeta:

$$\mu \text{ moles de NADH} = \frac{\overline{ADO} \times f \times V_1 \times V_2}{E \times 10^{-3} \times V_3 \times 1 \text{ cm.}}$$

f= factor de dilución de la muestra que fue 6.

V_1 = volúmen de la cubeta, 3ml.

V_2 = volúmen total de sobrenadante.

E = coeficiente de extinción molar del NADH ($6.220 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

V_3 = volúmen de muestra diluída añadida a la mezcla de reacción 0,1ml.

1cm, corresponde al paso de luz por la cubeta.

En el desarrollo embrionario, por ser los valores más bajos, se expresaron en nM de NADH/min./embrión.

Para calcular la actividad específica LDH se determinó la cantidad de proteína en los sobrenadantes por el método de Lowry et.al (1951). Esta determinación se hizo sobre los mismos sobrenadantes en los que se midió la actividad total de la enzima. Las rectas patrón se construyeron con albúmina bovina. Se obtuvo la cantidad de proteína por embrión. El cociente entre la actividad total y este último valor nos da la actividad específica de la LDH expresada como μ ó n moles de NADH oxidados por minuto por mg. de proteína por cm. de paso de luz de la cubeta.

5.- Localización histoquímica de la LDH.

La localización histoquímica de la deshidrogenasa láctica se realizó por el método de Baba y Sharma (1971) modifica-

do por Rouband et al (1976). Se utilizaron los estados de blástula, gástrula y néurula. En primer lugar se libera a los embriones de la envuelta gelatinosa y de la membrana de fecundación. A continuación se procede de la siguiente forma:

a) fijación en formol-cacodilato- Ca^{++} a pH 7,0. La composición del fijador es la siguiente:

- Cacodilato sódico 50mM
- Cloruro cálcico ($\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 9mM
- Formaldehído 1%
- Sacarosa 10mM

La fijación se realiza durante 3 horas a 4°C en el frigorífico. Se utiliza un volúmen de unos 5 ml de fijador por embrión. Se agita cada 15 minutos. El pH se ajusta con ácido clorhídrico 0,1N.

b) Paso a solución de lavado:

- Cacodilato sódico 50mM
- Cloruro cálcico ($\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 9mM
- Sacarosa 0,17M

El pH se ajusta a 7.0 con ácido clorhídrico 0,1N. Los embriones se mantienen durante dos horas a 4°C en esta so-

lución.

c) Para mejorar la penetración de los reactivos, se pasan los embriones a un medio de preincubación durante toda la noche y a 4°C:

- Cacodilato sódico 42mM
- Cloruro cálcico 7,5mM
- Nitroazul de tetrazolio (NBT) 0,2mM
- NAD⁺ 0,5mM
- PMS 0,05mM
- ClH 0,1 N hasta pH 7,0

d) La incubación se realiza durante 1 hora a 37°C. Se utilizaron tres medios distintos de incubación:

d₁) medio de preincubación al que se le añade D-L-Lactato sódico 99mM.

d₂) medio de preincubación al que se le añade D-L-Lactato sódico 99mM y ácido oxámico 1mM.

d₃) medio de preincubación sólo (no se añade lactato). Este tercer medio se utiliza como control.

Al terminar el período de incubación la reacción se detiene pasando las muestras a solución de lavado (b) a 4°C.

Se fotografían las muestras en esta solución a través de una lupa binocular con cámara fotográfica incorporada.

A continuación se procede con estas muestras al estudio histológico que se realizó según el método de Sentein (1976) para anfibios. El método se detalla a continuación:

1) Fijación en oscuridad durante 24 horas a temperatura ambiente. El fijador utilizado tiene:

- Nitrato de cobalto 60mM
- Cloruro de mercurio 0,25M
- Acido acético 3,8%
- Formaldehido 7,3%

2) Se lava tres veces durante dos horas cada vez en agua destilada.

3) Deshidratación rápida:

- etanol 30% ---- 10min.
- " 50% ----- 10min.
- " 70% ----- 2x5min.
- " 80% ----- 2x5min.
- " 90% ----- 2x5min.
- butanol ----- 2x3min.

- 4) Benceno 3 veces x 3 minutos.
- 5) Preinclusión en parafina de 48°C. Se pasa por 4 baños de 10 minutos.
- 6) Inclusión definitiva en paraplasto 55°C.
- 7) Desparafinado por calentamiento seguido de tres baños de tolueno.
- 8) Hidratación pasando por alcohol de 100°, 95°, 70° y agua.
- 9) Coloración. Se utilizó carmín alumbre para los núcleos. Este colorante contenía carmín 40 de histología al 1% (peso en volúmen) y alumbre de potasa al 4% (peso en volúmen). Esta mezcla se hierve durante 20 minutos. La coloración se realiza en 15 minutos. El citoplasma se tiñó con amarillo naftol al 0,2% (peso en volúmen) y la coloración duró cinco segundos. A continuación se deshidrató con tolueno.
- 10) Montaje en bálsamo de Canadá.

6.- Microscopia electrónica.

La microscopia electrónica se realizó en tres fases:

- Fijación con glutaraldehído y post-fijación con ácido osmico.
- Inclusión en araldita
- Preparación y observación de rejillas.

A) Fijación

Para la fijación se prepararon tres soluciones madre:

Solución A Fosfato monosódico al 2,26%

" B Hidróxido sódico al 2,52%

" C Glucosa al 5,4%

Con estas soluciones base se preparan:

Milloning - Solución A --- 41,5 ml

" B --- 8,5 ml

De esta mezcla se separan 5 ml y se reemplazan por 5 ml de solución C. Se añaden además 0,5 ml de cloruro cálcico al 1% para reforzar las membranas.

Para la fijación en Milloning sólo, no se añade la di solución C.

Milloning-Glutaraldehido

4 volúmenes de Milloning sin glucosa

1 volúmen de glutaraldehido al 25%

Desarrollo de la fijación:

- 1) Se fijan los tejidos (músculo caudal) en Milloning-Glutaraldehido en nevera durante 4 horas.
- 2) Se cambia el medio por Milloning con glucosa y renovando primero 4 veces cada 30 minutos se deja durante la noche.
- 3) Al día siguiente se cambia a Milloning con glucosa y Cl_2Ca con tetróxido de osmio al 2%, durante dos horas.

B) Inclusión

- 1^{er}. día.-
- 1) Lavado en agua destilada.
 - 2) Acetona al 30% en agua destilada, 30min.
 - 3) Acetona al 50% 30 min.
 - 4) Acetona al 70% 30 min.
 - 5) Acetona al 70% más contraste. 12 horas.

2º día.- Se ponen las cápsulas en estufa a 37°C.

- 1) Acetona al 90%. 30 min.
- 2) Acetona al 100%. 30 min.
- 3) Acetona con sulfato de cobre. 30 min.
- 4) Oxido de propileno. 1 hora. Se cambia dos veces.
- 5) Oxido de propileno más Araldita I en proporción 3:1. 2 horas.
- 6) Oxido de propileno con Araldita I (2:2). 2 horas.
- 7) Oxido de propileno más Araldita I (1:3). 12-24 horas.

3^{er} día.-

- 8) Araldita I (estufa a 50°C, 2 horas)
- 9) Araldita I (estufa a 50°C, 12-24 horas).

4º día.-

- 10) Araldita II (estufa a 50°C, 1 hora).
- 11) Araldita II (estufa a 50°C, 1 hora).

Las muestras se pasan a cápsulas de gelatina secas que se llenan con araldita II y se ponen a 70°C durante 48 horas para el endurecimiento.

- Araldita I

Componente B-azul-endurecedor. 10ml.

Componente D-verde-plastificante. 0,15ml.

Componente A/M-rojo-resina epoxi. 10ml.

- Araldita II

Componente B-azul-endurecedor. 10ml.

Componente C-amarillo-acelerador. 0,4ml.

Componente D-verde-plastificante. 0,15ml.

Componente A/M-resina epoxi. 10ml.

C) Preparación y observación de rejillas

Se tallaron pirámides en las rejillas. Se realizaron cortes finos de 2 μ los cuales se observaron en un microcopio de contraste de fase. A continuación se hicieron los cortes ultrafinos con un ultramicrotomo. El espesor aproximado fue de 1.000 Å. Se utilizaron cuchillas de vidrio y rejillas de cobre. Los cortes se contrastaron con citrato de plomo. Toda la técnica y observación al microcopio electrónico se realizó en el Departamento de Oncología del Ministerio de Sanidad.

7.- Métodos estadísticos.

a) Características muestrales.

En todos los casos en que se obtuvieron medidas con-

tinuas como resultado de las observaciones, se utilizó la media como medida de centralidad y la varianza, desviación típica y coeficiente de variación como medidas de dispersión. Cuando se relacionaron dos variables a la vez para calcular el índice de correlación entre ellas se utilizó también la covarianza como medida de dispersión. Estos parámetros se calcularon con un computador digital. Sus fórmulas matemáticas son:

- media aritmética:

$$X = E \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{n} \quad \text{siendo } n \text{ el número de datos.}$$

- la varianza muestral corregida por utilizar muestras pequeñas:

$$V = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}$$

- La desviación típica que se obtiene como la raíz cuadrada de la varianza:

$$D.T. = \sqrt[+2]{V}$$

- La covarianza corregida para tamaño muestral bajo:

$$\text{Cov (xy)} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i - n \bar{X} \bar{Y}}{n-1}$$

- El coeficiente de variación expresado en % :

$$C.V. = \frac{D.T.}{\bar{X}} \times 100$$

- En el caso de los diagramas de barras, la altura de cada barra representa la media. Sobre ella se dibujó el error típico de la media que se calcula como:

$$D.T. \frac{D.T.}{\bar{X}} = \sqrt{V \frac{D.T.}{\bar{X}}} = \frac{D.T.}{\sqrt{n}}$$

b) Prueba t de Student

Para la comparación de muestras se utilizó la prueba t de Student, que lleva este nombre por haber sido tabulada por W.S. Gosset que firmaba con el seudónimo de Student. La aplicación de esta prueba es especialmente útil en el caso de comparar dos muestras de tamaño pequeño cuando no se conoce la varianza de la población y por tanto tiene que ser estimada a partir de los datos de la muestra como es nuestro caso. El método se basa en la comparación de la diferencia entre dos medias con la desviación típica de esa diferencia. Para obtener el valor de t se utilizaron las expresiones siguientes:

1) Tamaños muestrales idénticos:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{V_1 + V_2}{n}}}$$

Siendo V_1 y V_2 las varianzas de las dos muestras.

2) Tamaños muestrales diferentes:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{V_1(n_1-1) + V_2(n_2-1)}{n_1+n_2-2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}}$$

- n_1 y n_2 son los tamaños muestrales de las dos muestras analizadas.
- El número de grados de libertad es $2(n-1)$ en el caso 1) y $n_1 + n_2 - 2$, en el caso 2).
- El nivel mínimo de significación escogido fue el correspondiente al 5%. Es decir, que sólo se consideraron significativas las diferencias entre dos medias si el valor calculado de t correspondía a una probabilidad $p < 0,05$. Operando así, cuando decimos que existen diferencias significativas entre dos medias, la probabilidad de equivocarnos es menor del 5%.

c) Prueba χ^2

Se utilizó en el caso de los cruzamientos entre individuos con fenotipos LDH diferentes. Esta prueba tiene especial utilidad en este caso, ya que se utiliza en el caso de variables discontinuas divididas en dos o más clases. Se basa en la comparación entre los valores observados y los esperados según una cierta hipótesis de trabajo. La no significación de la prueba supone la aceptación en principio, de la hipótesis planteada. El valor de la χ^2 se calculó como:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{i=n} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

- O_i son los valores observados
- E_i son los valores esperados.

El número de grados de libertad es igual al número de clases menos 1. El nivel de significación mínimo escogido fue también en este caso el correspondiente a una probabilidad $p < 0,05$.

d) Análisis de varianza

En los casos en que se querían comparar diferencias entre más de dos muestras correspondientes a una misma variable, medida con distintos tratamientos o en diferentes

grupos, se utilizó el análisis de varianza. Este análisis presenta la ventaja de disminuir el volúmen de trabajo ya que utilizando pruebas t para comparar n medias dos a dos, habría que utilizar $\binom{n}{2}$ pruebas t. Además se correría el riesgo en este caso de que dos de las muestras comparadas viniesen de los dos extremos de la distribución con lo que se obtendrían resultados significativos en apariencia cuando no lo serían en realidad.

Se utilizaron dos tipos de análisis de varianza:

d₁) Análisis jerárquico simple

Se utilizó en los casos en que había I muestras con J observaciones en cada muestra.

El método se basa en la comparación de las varianzas entre grupos con las varianzas dentro de cada grupo. Esta relación está tabulada para diferentes grados de libertad y se conoce como distribución F debido a R.A. Fisher. Si el valor de F es significativo se acepta que al menos una de las medias difiere de las demás.

El valor de F se calcula como sigue: /

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>S.C.</u>	<u>M.C.</u>
Externa	I-1	$\sum_i \frac{X_{i.}^2}{J} - \frac{X_{..}^2}{IJ}$	$\frac{S.C.E}{I-1}$
Interna	I(J-1)	$\sum_i \sum_j X_{ij}^2 - \sum_i \frac{X_{i.}^2}{J}$	$\frac{S.C.I}{I(J-1)}$

Donde:

g.l. = n° de grados de libertad

S.C. = suma de cuadrados

M.C. = media de cuadrados

$$X_{i.} = \sum_{j=1}^J X_{ij}$$

$$X_{..} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J X_{ij}$$

El valor de F se obtiene como:

$$F = \frac{\frac{I-1}{I(J-1)} \frac{MC_E}{MC_I}}$$

d₂) Análisis jerárquico simple desequilibrado.

Se utilizó cuando el número de observaciones es dis-

tinto al menos en uno de los grupos. En este caso cada

grupo tiene J_i observaciones y en total tenemos $T = \sum_{i=1}^I J_i$

observaciones. En este caso la fórmula tabular es:

<u>Fuente de variación</u>	<u>g.l.</u>	<u>S.C.</u>	<u>M.C.</u>
Externa	I-1	$\sum_i \frac{X_{i.}^2}{J_i} - \frac{X_{..}^2}{T}$	$\frac{S.C.E}{I-1}$
Interna	T-I	$\sum_i \sum_j X_{ij}^2 - \sum_i \frac{X_{i.}^2}{J_i}$	$\frac{S.C.I}{T-I}$

El valor de F, igual que en el apartado anterior se obtiene como

$$F = \frac{\frac{I-1}{T-I} MC_E}{MC_I}$$

Cuando este valor de F calculado resulta ser mayor que el que dan las tablas para el nivel de probabilidad deseado ($p < 0.05$), hay diferencia significativa al menos en una de las medias.

e) Prueba de Scheffé

Para calcular la significación entre las medias tomadas dos a dos, se utilizó el método de Scheffé, que utiliza los parámetros del análisis de varianza. Consiste en el cálculo de la cantidad S:

$$S = \sqrt{\frac{I-1}{(I-1) F (T-I)}} \cdot D.T. (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)$$

Siendo \bar{X}_1 y \bar{X}_2 las dos medias que se comparan y

$$D.T. (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) = MC_I \left(\frac{1}{J_1} + \frac{1}{J_2} \right)$$

Si el valor de S calculado para una $p < 0.05$ es menor que la diferencia entre las dos medias en valor absoluto $|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|$, se acepta que existen diferencias

significativas entre ambas.

En todas las tablas cuando se utilizan pruebas estadísticas el número de asteriscos corresponde a las probabilidades de significación en la siguiente forma:

* : $p < 0,05$

** : $p < 0,025$

*** : $p < 0,01$

****: $p < 0,005$

f) Ajuste de rectas de regresión por mínimos cuadrados.

Se utilizaron para obtener ecuaciones que pudiesen predecir el valor de una variable al conocer el de otra. Se utilizó siempre el modelo lineal. Se ajustaron los datos que relacionan las dos variables a rectas de regresión de la forma $y=a+bx$. Como recta de mejor ajuste se escogió la que presentaba desviaciones cuadráticas mínimas respecto a los puntos. Los coeficientes se calcularon como:

$$a = \bar{y} - b\bar{x}, \quad b = \frac{\sum_i X_i Y_i - \frac{\sum_i X_i \sum_i Y_i}{n}}{\sum_i X_i^2 - \frac{(\sum_i X_i)^2}{n}}$$

El coeficiente de correlación (r) entre las dos variables se calculó como:

$$r = \frac{\text{Cov (xy)}}{\text{D.T.}_X \cdot \text{D.T.}_Y}$$

El error típico de r: $E.T. (r) = \sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}$

Para comprobar si r es o no significativamente distinto de cero se calculó:

$$F_{\frac{1}{n-2}} = \frac{r^2 (n-2)}{1-r^2}$$

ya que el cociente situado a la derecha de la igualdad se distribuye según una F con grados de libertad 1 y n-2. Se utilizó un nivel de significación correspondiente a una probabilidad $p < 0.05$

Para los métodos estadísticos se utilizó como fuente bibliográfica el libro de J. Neter (1.976).

R_E_S_U_L_T_A_D_O_S

I HETEROGENEIDAD DE LA LDH

1.- Movilidad electroforética.-

La electroforesis de los sobrenadantes de extractos de órganos en Discoglossus pictus, tanto en los adultos, como en larvas y embriones completos, muestra la existencia de un polimorfismo en el sistema isoenzimático de la LDH. Al utilizar un gel con columna doble de poliacrilamida, se pueden observar tres tipos de patrones electroforéticos en los distintos individuos tal como aparecen en la figura 1. Los tres patrones difieren en la movilidad de las isoenzimas respecto al origen, por lo que los hemos clasificado como fenotipo rápido (a), intermedio (b) y lento (c) respectivamente. El fenotipo rápido presenta la movilidad máxima y el fenotipo lento la mínima, presentando el intermedio una movilidad intermedia entre las de los otros dos. El tipo de movilidad LDH es una característica constante de forma que se mantiene en todos los órganos de un mismo animal, así como durante el desarrollo larvario y en el adulto. La identificación del fenotipo LDH se realiza de visu sin necesidad de recurrir a medidas cuantitativas.

La diferencia de movilidad electroforética entre los tres patrones depende de la isoenzima que se considere, siguiendo un gradiente desde la LDH-5 hasta la LDH-1. La

LDH-5 es la isoenzima que presenta mayor diferencia de movilidad al comparar los tres fenotipos. La LDH-4 presenta ya diferencias menores, las cuales, se hacen aún más pequeñas en las isoenzimas LDH-3 y LDH-2. La LDH-1 no presenta ningún tipo de variación en su movilidad electroforética al comparar los tres fenotipos (fig.1).

El patrón de fenotipo intermedio presenta además una LDH-5 más ancha que la existente en los patrones rápido y lento.

Para cuantificar las diferencias de movilidad entre los tres fenotipos se midió la movilidad electroforética en 31 larvas en estado VII procedentes de un cruzamiento entre dos individuos de tipo LDH intermedio. De las 31 larvas analizadas, seis eran de tipo rápido, veinte de tipo intermedio y cinco de tipo lento. La movilidad electroforética se midió sobre los densitogramas obtenidos a partir de cada patrón electroforético y se calculó para cada isoenzima como el cociente entre la distancia desde el pico de la isoenzima hasta el origen y la distancia total (origen-fin de la LDH-1). El fin de la LDH-1 se definió como el punto en el que la gráfica alcanza la línea base. Los resultados, multiplicados por cien, aparecen en la tabla II. La LDH-1 es la única isoenzima que no presenta diferencias significativas de movilidad al comparar los tres fenotipos. En las otras cuatro isoenzimas exis-

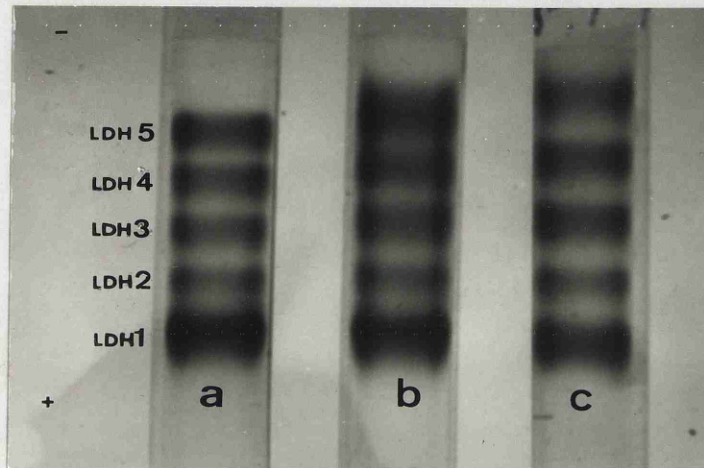


Fig. 1.- a= fenotipo rápido; b= fenotipo intermedio; c= fenotipo lento. Estado VII.

T A B L A I I

COMPARACION DE LA MOVILIDAD ELECTROFORETICA DE LAS ISOENZIMAS EN LOS TRES FENOTIPOS LDH

<u>ISOENZIMAS</u>	<u>RAPIDO</u> (6)	(a)	<u>INTERMEDIO</u> (20)	(b)	<u>LENTO</u> (5)
LDH 1	91,4 ⁺ 1,3		90,1 ⁺ 0,9		90,0 ⁺ 1,1
LDH 2	79,4 ⁺ 1,2	****	75,9 ⁺ 2,1	**	73,0 ⁺ 1,3
LDH 3	67,6 ⁺ 1,5	****	62,7 ⁺ 1,9	****	58,4 ⁺ 1,2
LDH 4	55,5 ⁺ 1,9	****	49,4 ⁺ 2,0	****	44,0 ⁺ 1,4
LDH 5	43,8 ⁺ 1,7	****	36,7 ⁺ 2,1	****	30,5 ⁺ 1,8

-156-

- Los números son medias ⁺ desviación típica. () = número de geles medidos por fenotipo. El análisis de varianza muestra diferencias significativas entre los grupos en todas las isoenzimas excepto la LDH 1. Prueba de Scheffé: * diferencia significativa (p < 0.025); *** diferencia significativa (p < 0.005).
- (a) = comparación entre RAPIDO e INTERMEDIO.
- (b) = comparación entre INTERMEDIO y LENTO.

ten diferencias significativas entre los fenotipos rápido e intermedio y entre los fenotipos intermedio y lento. La movilidad varía significativamente entre los fenotipos intermedio y lento en la LDH 2 ($0,01 < p < 0,025$). En todas las demás comparaciones la significación corresponde a una probabilidad $p < 0,005$. La movilidad varía desde 73,0 hasta 79,4 en la LDH-2; y desde 30,5 hasta 43,8 en la LDH-5 al comparar los fenotipos lento y rápido. Lo mismo ocurre en las demás comparaciones, es decir que las diferencias de movilidad entre los fenotipos aumentan progresivamente conforme aumenta el número de subunidades de tipo M de que está compuesta la isoenzima a comparar. Esto se expresa gráficamente en la figura 2. Aparecen representadas en esta figura tres regresiones lineales entre el número de subunidades $M(x)$ de cada isoenzima (1 para la LDH2, 2 para la LDH 3, 3 para la LDH4 y 4 para la LDH5) y las diferencias de movilidad electroforética (y) entre los distintos fenotipos LDH para cada isoenzima. Estas diferencias de movilidad entre fenotipos se calcularon a partir de la Tabla II. Así, en la comparación rápido-lento para la LDH 2, el número de subunidades M es 1 y la diferencia de movilidad es 6,4% ($79,4\% - 73,0\%$). Las rectas se ajustaron por el método de los mínimos cuadrados. La isoenzima LDH 1 no se representó por no mostrar diferencias de movilidad entre los distintos tipos.

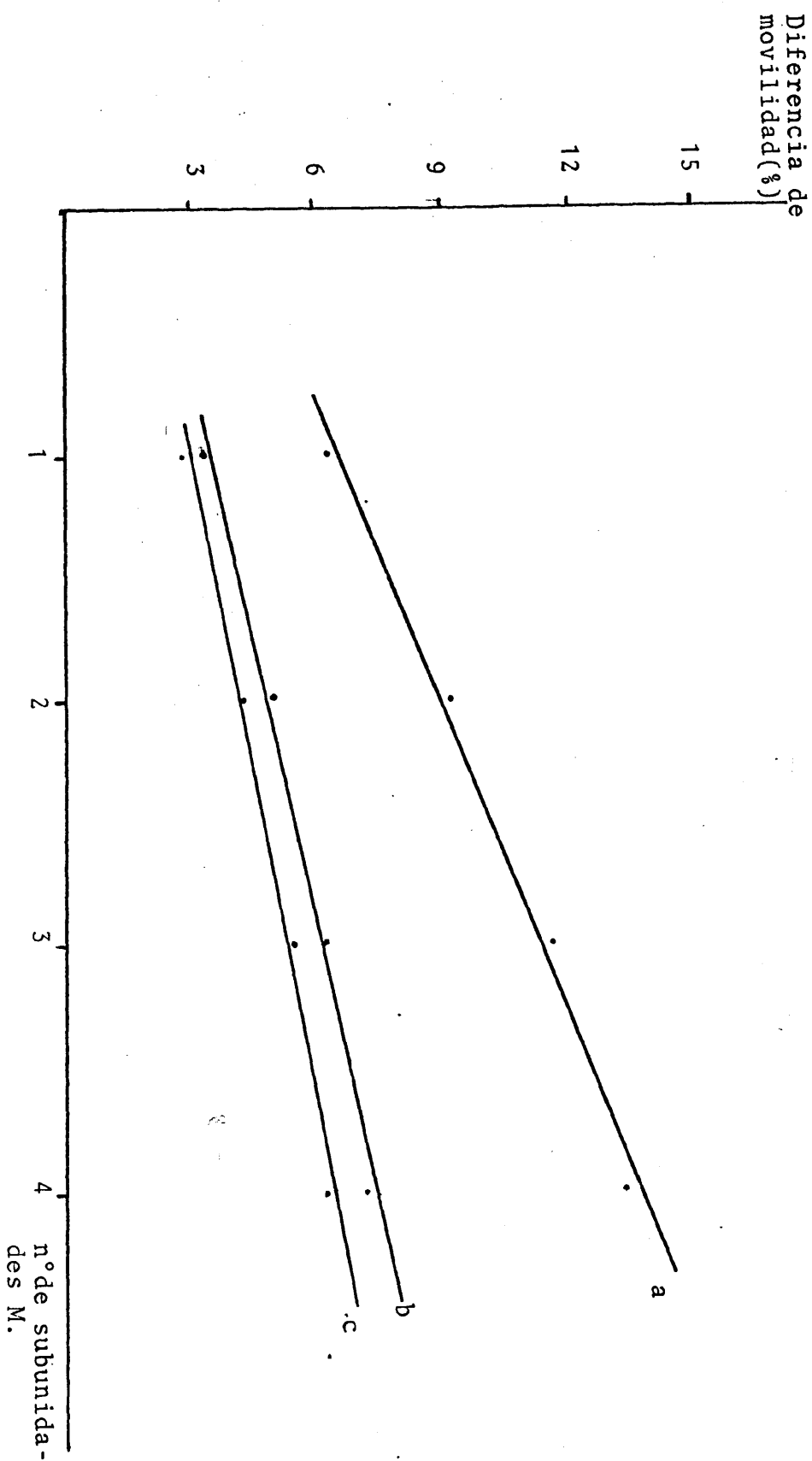


Fig. 2.- RECTAS DE REGRESION ENTRE EL NUMERO DE SUBUNIDADES M Y LA DIFERENCIA DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA PARA LAS ISOENZIMAS LDH 2,3,4 Y 5. a= Diferencia rápida-lento; b = Diferencia rápida-intermedio; c = Diferencia intermedio-lento.

La recta que compara los fenotipos rápido y lento (fig. 2a) presenta la ecuación $y = 4,25 + 2,33x$; el coeficiente de correlación r es 0,994 y su error típico 0,075; este coeficiente de correlación resultó ser significativamente distinto de cero ($0,005 < p < 0,01$). Al comparar los fenotipos rápido e intermedio (fig. 2b) se obtuvo la recta $y = 2,3 + 1,23x$, un coeficiente de correlación $r = 0,996$ con un error típico de 0,064; r fue significativamente distinto de cero ($p < 0,005$). Por último, la recta que refiere la comparación entre los fenotipos intermedio y lento (fig. 2c) tiene la ecuación $y = 1,95 + 1,1x$, y r es significativamente distinto de cero ($0,005 < p < 0,01$) presentando un valor de 0,993 con un error típico de 0,084.

2.- Cruzamientos.

Se han realizado todos los cruzamientos posibles entre los tres fenotipos LDH para esclarecer el tipo de herencia de este polimorfismo. La identificación del fenotipo de los padres se realizó mediante una operación previa a los cruzamientos extrayendo una porción de músculo gastrocnemio a cada individuo tal y como se describe en la sección Materiales 3-A. En todos los cruzamientos, los totales de cada fenotipo en la descendencia se calcularon sumando los individuos analizados en estados del desarrollo posteriores al 27. La razón de este hecho es que, como veremos más adelante, en estados anteriores al 27

la LDH del embrión es de tipo materno, no comenzando hasta este estado la expresión fenotípica del genotipo del embrión. Los resultados obtenidos en cada cruzamiento se compararon mediante pruebas χ^2 , con los esperados según nuestra hipótesis de trabajo. Esta hipótesis plantea un control de los tres fenotipos por dos alelos situados en el mismo locus con dominancia intermedia. Los fenotipos rápido y lento serían homocigotos mientras que el fenotipo intermedio sería el heterocigoto. Los resultados de los cruzamientos se detallan a continuación.

a) Cruzamiento n°1

Se cruzó una hembra de fenotipo rápido por un macho de fenotipo rápido. Los resultados aparecen en la tabla III. Durante los estados embrionarios 7 y 16, se obtiene un 100% de embriones con fenotipo materno, esto es, fenotipo rápido. Durante los estados larvarios I, III, XIV, XIX y XXV se analizaron 85 larvas resultando todas ellas ser de fenotipo rápido. Los resultados no presentan diferencias significativas con lo esperado según la hipótesis de trabajo ($p < 0,05$).

b) Cruzamiento n°2

Se cruzó una hembra de fenotipo rápido por un macho de fenotipo intermedio. Los resultados aparecen en la tabla

T A B L A III

<u>CRUZAMIENTO 1</u>	<u>ESTADO</u>	<u>Nº</u>	<u>FENOTIPO DE LA DESCENDENCIA</u>		
			<u>Rápido</u>	<u>Intermedio</u>	<u>Lento</u>
♀ RAPIDA x ♂ RAPIDO	7	8	8	---	---
	16	8	8	---	---
	I	7	7	---	---
	III	16	16	---	---
	XIV	40	40	---	---
	XIX	8	8	---	---
	XXV	14	14	---	---
Total observado ¹		85	85		
Total esperado		85	85		

1.- El total es la suma de los datos posteriores al estado 27.

Nº= número de embriones analizados por estado.

ESTADO = estado del desarrollo.

No hay diferencias significativas. Prueba χ^2 $p < 0.05$.

IV. Tanto en el estado 7 como en el estado 16, los 8 embriones analizados presentan el fenotipo materno, rápido. Sin embargo, en algunos de los embriones en estado 16 empieza a aparecer una ligera tendencia hacia el fenotipo intermedio pero son todavía claramente clasificables como rápidos. En el estado 27 ya se pueden distinguir dos patrones distintos. De los 16 embriones analizados en este estado, 10 son de fenotipo rápido y 6 de fenotipo intermedio. Los patrones de tipo intermedio observados en este estado tienen casi ya la movilidad electroforética típica del fenotipo intermedio y se distinguen con toda claridad de los de fenotipo rápido. En el estado 30, de los 15 embriones analizados, 7 son rápidos y 8 son ya típicamente intermedios. En el estado VII, de 8 larvas, 3 son rápidas y 5 son intermedias. Se obtiene un total de 20 individuos rápidos frente a 19 intermedios, resultando que se ajusta excelentemente a la segregación 1:1 esperada. Las diferencias no son significativas ($p < 0,05$).

c) Cruzamiento n°3

Cruzamiento entre una hembra de fenotipo rápido y un macho de fenotipo lento. Los resultados, que aparecen en la tabla V muestran la persistencia del fenotipo

T A B L A I V

<u>CRUZAMIENTO 2</u>	<u>ESTADO</u>	<u>Nº</u>	<u>FENOTIPO DE LA DESCENDENCIA</u>		
			<u>Rápido</u>	<u>Intermedio</u>	<u>Lento</u>
	7	8	8	---	---
♀ RAPIDA x ♂ INTERMEDIO	16	8	8	---	---
	27	16	10	6	---
	30	15	7	8	---
	VII	8	3	5	---
Total observado ¹		39	20	19	
Total esperado		39	19,5	19,5	

1.- El total es la suma de los datos posteriores al estado 27 incluido.

Nº= número de embriones analizados por estado.

ESTADO = Estado del desarrollo.

No hay diferencias significativas. Prueba χ^2 $p < 0.05$.

T A B L A V

<u>CRUZAMIENTO 3</u>	<u>ESTADO</u>	<u>Nº</u>	<u>FENOTIPO DE LA DESCENDENCIA</u>		
			<u>Rápido</u>	<u>Intermedio</u>	<u>Lento</u>
	16	8	8	---	---
♀ RAPIDA x ♂ LENTO	I	16	---	16	---
Total Observado ¹		16	---	16	---
Total esperado		16	---	16	---

1.- El total es la suma de los datos posteriores al estado 27.

Nº= número de embriones analizados por estado.

ESTADO = estado del desarrollo.

No hay diferencias significativas. Prueba χ^2 $p < 0,05$.

materno en el estado 16 al obtenerse un 100% de embriones rápidos en dicho estado. En el estado I se analizan 16 larvas, todas las cuales muestran fenotipo intermedio. Este resultado se ajusta perfectamente al esperado.

d) Cruzamiento n°4

Cruzamiento entre una hembra de fenotipo intermedio y un macho de fenotipo intermedio. En la tabla VI aparecen los resultados. Tanto en el estado 7 como en el 16 todos los embriones presentan fenotipo materno, es decir, intermedio. En el estado VII, de 31 larvas analizadas, 6 presentaron fenotipo rápido, 20 fenotipo intermedio y 5 fenotipo lento. Este resultado no muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) con la segregación 1:2:1 esperada.

e) Cruzamiento n°5

En la tabla VII aparecen los resultados obtenidos en el cruzamiento entre una hembra lenta y un macho intermedio. Como en los casos anteriores, todos los embriones analizados en los estados 7 y 16, presentan el fenotipo materno que en este caso es el lento. En el estado III, de 16 larvas, 7 fueron intermedias y 9 lentas mientras que en el estado XII se obtuvieron 2 larvas en

T A B L A VI

CRUZAMIENTO 4

	<u>ESTADO</u>	<u>N°</u>	<u>FENOTIPO DE LA DESCENDENCIA</u>		
			<u>Rápido</u>	<u>Intermedio</u>	<u>Lento</u>
	7	8	---	8	---
♀ INTERMEDIA x ♂ INTERMEDIO	16	8	---	8	---
	VII	31	6	20	5
Total observado ¹		31	6	20	5
Total esperado		31	7,75	15,5	7,75

1.- El total es la suma de los datos posteriores al estado 27.

N°= número de embriones analizados por estado.

ESTADO = estado del desarrollo.

No hay diferencias significativas. Prueba χ^2 $p < 0.05$.

T A B L A VII

<u>CRUZAMIENTO 5</u>	<u>ESTADO</u>	<u>Nº</u>	<u>FENOTIPO DE LA DESCENDENCIA</u>		
			<u>Rápido</u>	<u>Intermedio</u>	<u>Lento</u>
	7	8	---	---	8
♀ LENTA x ♂ INTERMEDIO	16	8	---	---	8
	III	16	---	7	9
	XII	8	---	2	6
Total observado ¹		24	---	9	15
Total esperado		24	---	12	12

1.- El total es la suma de los datos posteriores al estado 27.

Nº= número de embriones analizados por estado.

ESTADO = Estado del desarrollo.

No hay diferencias significativas. Prueba χ^2 $p < 0.05$.

intermedias y 6 lentas de un total de 8. Esto arroja un total de 24 larvas de las cuales 9, fueron intermedias y 15 lentas. Este resultado aunque algo desequilibrado no presenta variaciones significativas respecto a lo esperado ($p < 0,05$).

f) Cruzamiento nº6

En la tabla VIII aparecen los resultados referentes al sexto y último cruzamiento, realizado entre dos individuos de fenotipo lento. Tanto en el estado 16 como en el estado IV, todos los individuos estudiados presentaron fenotipo lento, lo cual se ajusta con exactitud a lo esperado.

3.- Distribución de frecuencias de los tres fenotipos.

Se han utilizado dos zonas de captura de animales adultos en Madrid. Las dos zonas son: Zona A (Huerta del Obispo) y zona B (Parque del Oeste). Ambas son zonas de tamaño pequeño con un curso de agua corriente de unos 75-100 metros de longitud. Las dos zonas están aisladas del exterior por barreras mecánicas artificiales que hacen poco probable la posibilidad de contacto con otras poblaciones. Esto es especialmente difícil en la zona A. El riachuelo de la zona A lleva agua claramente más sucia y menos oxigenada que el de la zona B.

T A B L A VIII

<u>CRUZAMIENTO 6</u>	<u>ESTADO</u>	<u>Nº</u>	<u>FENOTIPO DE LA DESCENDENCIA</u>		
			<u>Rápido</u>	<u>Intermedio</u>	<u>Lento</u>
	16	8	---	---	8
♀ LENTA x ♂ LENTO	IV	16	---	---	16
Total observado ¹		16	---	---	16
Total esperado		16	---	---	16

1.- El total es la suma de los datos posteriores al estado 27.

Nº= número de embriones analizados por estado.

ESTADO = estado del desarrollo.

No hay diferencias significativas. Prueba χ^2 $p < 0.05$.

En la tabla IX se muestra la distribución por fenotipos de los individuos capturados en ambas zonas. En la zona A, de 35 animales adultos capturados, 23 fueron de fenotipo rápido, 11 de fenotipo intermedio y 1 de fenotipo lento. En la zona B, sin embargo, se encontró una distribución muy diferente ya que de los 54 animales adultos capturados, 7 fueron de fenotipo rápido, 26 de fenotipo intermedio y 21 de fenotipo lento. Ambas distribuciones de resultados, se compararon con las que habría que esperar en caso de que las dos poblaciones estuviesen en equilibrio Hardy-Weinberg para el carácter. Las diferencias entre los valores observados y los esperados no fueron significativas ($p < 0,05$) en ninguno de los dos casos. Partiendo de nuestra hipótesis que supone que el control genético de este polimorfismo está basado en la existencia de dos alelos en un mismo locus que codificarían las dos subunidades M (rápida) y M' (lenta), se calcularon las frecuencias genotípicas, y de éstas, las frecuencias génicas estimadas en las dos zonas. Como muestra la tabla IX la frecuencia génica p del alelo que sintetizaría la subunidad rápida (M), tiene un valor de 0,81 en la zona A y de 0,37 en la zona B. La frecuencia génica del otro alelo, que sintetizaría la subunidad lenta (M'), aparece con un valor de 0,19 en la zona A y 0,63 en la zona B.

T A B L A I X

DISTRIBUCION DE LOS TRES FENOTIPOS LDH EN DOS ZONAS DE CAPTURA

	RAPIDO	INTERMEDIO	LENTO	TOTAL	p	q
Zona A	Nº Observado	23	11	1	35	0,81
	Nº esperado ¹	22,96	10,78	1,26		0,19
Zona B	Nº Observado	7	26	21	54	0,37
	Nº esperado ¹	7,40	25,16	21,44		0,63

- 1.- Los valores esperados corresponden a un equilibrio Hardy-Weinberg.
- Zona A = Huerta del Obispo, Madrid; Zona B = Parque del Oeste, Madrid.
- p = frecuencia génica del gén que origina el fenotipo rápido.
- q = frecuencia génica del gén que origina el fenotipo lento.
- No hay diferencias significativas entre los valores observados y los esperados. Prueba χ^2 . $p < 0.05$.

En la tabla X aparece la distribución de los tres fenotipos en los dos sexos. Los datos se refirieron al total de animales capturados de cada sexo y se expresaron en tantos por cientos. Al operar así se obtienen porcentajes muy similares de cada fenotipo al comparar los dos sexos.

4.- Actividades y K_M de la LDH en los tres fenotipos.

a) Actividad relativa LDH

En la tabla XI se muestran los resultados obtenidos al medir la actividad relativa de las cinco isoenzimas y las subunidades en los tres fenotipos LDH. Este estudio se realizó sobre los 31 individuos hermanos en estado VII del desarrollo obtenidos en el cruzamiento n°4 realizado entre dos individuos de fenotipo intermedio. El estudio, realizado sobre extractos de animal completo, no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres fenotipos en ninguna de las isoenzimas LDH ni en las subunidades. El valor para las subunidades M en este caso se expresó utilizando el término en sentido amplio englobando a las dos subunidades supuestas M y M'.

b) K_M de las isoenzimas para el piruvato.

Los valores obtenidos para la K_M aparente con respecto

T A B L A X

DISTRIBUCION POR SEXOS DE LOS TRES FENOTIPOS LDH

	<u>RAPIDO</u>	<u>INTERMEDIO</u>	<u>LENTO</u>	<u>TOTAL</u>
Hembras	14 (35%)	16 (40%)	10 (25%)	40 (100%)
Machos	16 (32,7%)	21 (42,8%)	12 (24,5%)	49 (100%)

- Los datos corresponden a la suma de los individuos recogidos en ambas zonas de captura.
- Los números entre paréntesis expresan el % de individuos de un fenotipo respecto al total de individuos en su grupo de sexo.

T A B L A X I
ACTIVIDAD RELATIVA DE LAS ISOENZIMAS LDH EN LOS TRES FENOTIPOS DE MOVILIDAD ELECTROFORE
TICA. ESTADO VII

ISOENZIMAS (%)	FENOTIPO:		
	<u>RAPIDO</u>	<u>INTERMEDIO</u>	<u>LENTO</u>
	(6)	(20)	(5)
LDH 1	34,4 ± 4,3	34,6 ± 4,0	39,4 ± 6,2
LDH 2	12,4 ± 0,9	11,6 ± 1,2	11,8 ± 1,6
LDH 3	16,4 ± 1,6	17,4 ± 1,4	17,8 ± 1,2
LDH 4	17,3 ± 1,1	15,9 ± 2,5	14,3 ± 3,3
LDH 5	19,5 ± 3,9	20,5 ± 2,4	16,7 ± 5,7
SUBUNIDADES (%)			
H	56,2 ± 4,4	56,0 ± 3,6	60,7 ± 5,3
M	43,8 ± 4,4	44,0 ± 3,6	39,3 ± 5,3

() = nº de larvas por grupo. Los resultados se expresan como la media aritmética ± desviación típica. No hay diferencias significativas entre los grupos. Análisis de varianza. $p < 0.05$.

al piruvato en las isoenzimas LDH 1, LDH 5 rápida y LDH 5 lenta se muestran en la tabla XII. La LDH-1 se obtuvo en extractos de corazón + riñón, mientras que los dos tipos de LDH-5 procedieron del músculo sartorio. El número de animales utilizados fue de cinco para cada isoenzima, midiéndose la K_M en cada individuo de forma que los valores que aparecen en la tabla son las medias de cada grupo de cinco animales. Los dos tipos de LDH-5 presentaron valores similares para la K_M . La LDH-5 rápida muestra una K_M para el piruvato $3,1 \times 10^{-4} M$ con una desviación típica de $0,4 \times 10^{-4} M$, mientras que la LDH-5 lenta presenta una K_M de $3,2 \times 10^{-4} M$ con $0,5 \times 10^{-4} M$ como desviación típica. La LDH-1 en cambio, presenta una K_M más baja que la de los dos tipos de LDH-5: $1,5 \times 10^{-4} M$ con una desviación típica de $0,6 \times 10^{-4} M$.

La representación doble recíproca de Lineweaver-Burk para la LDH-1, LDH-5-rápida y LDH-5-lenta, aparece en las figuras 3,4 y 5 respectivamente. Los dos tipos de LDH-5 mostraron inhibición por substrato a la concentración de piruvato 2,72 mM. La LDH-1 sin embargo, mostró inhibición por substrato ya a partir de la concentración 0,68 mM de piruvato. Los datos obtenidos en concentraciones de substrato inhibitoras no se incluyeron en las representaciones gráficas ni en el cálculo de la K_M . La temperatura fue 20°C y el pH 7,0 en los tres casos.

T A B L A X I I

VALORES DE LA K_M PARA EL PIRUVATO EN LAS ISOENZIMAS LDH-1, LDH-5 RAPIDA Y LDH-5 LENTA.

	LDH 1 (5)	LDH5-RAPIDA (5)	LDH-5 LENTA (5)
K_M	$1,5 \times 10^{-4} M$	$3,1 \times 10^{-4} M$	$3,2 \times 10^{-4} M$

() = número de animales por Grupo. Los valores son medias aritméticas.

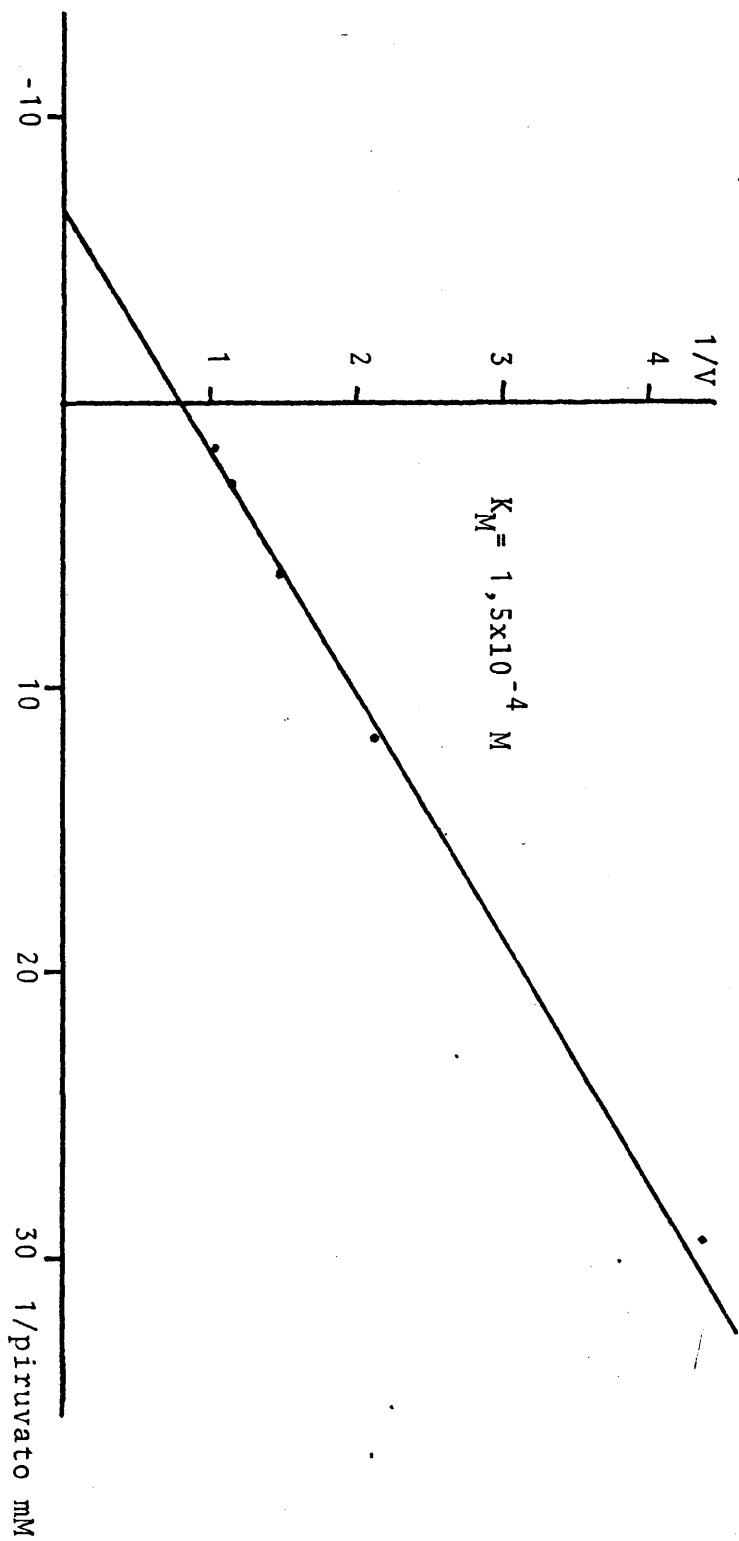


Fig. 3. - REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK DE LA LDH-1.
 $V = \mu\text{moles NADH/min.}/\text{mg. prot.}$

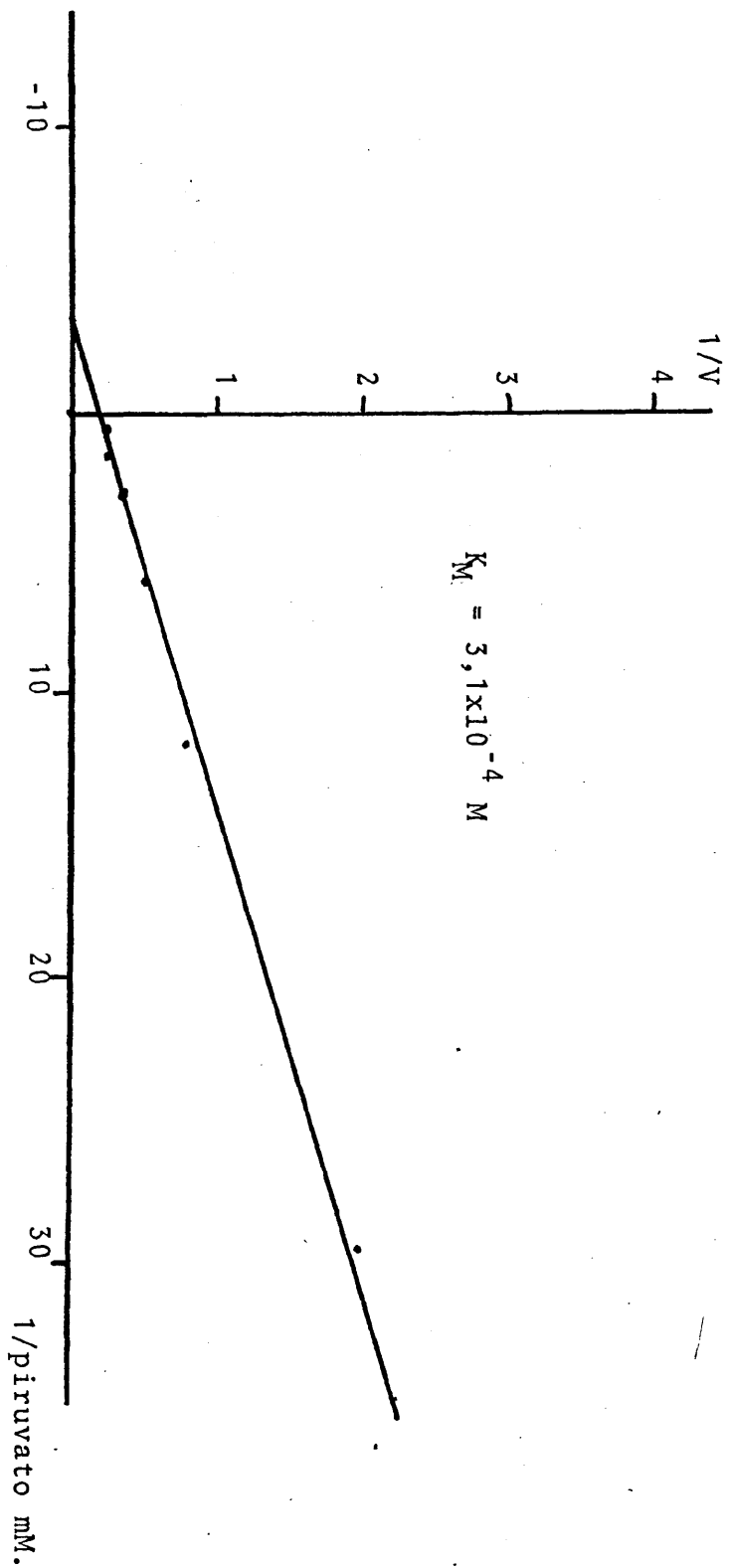
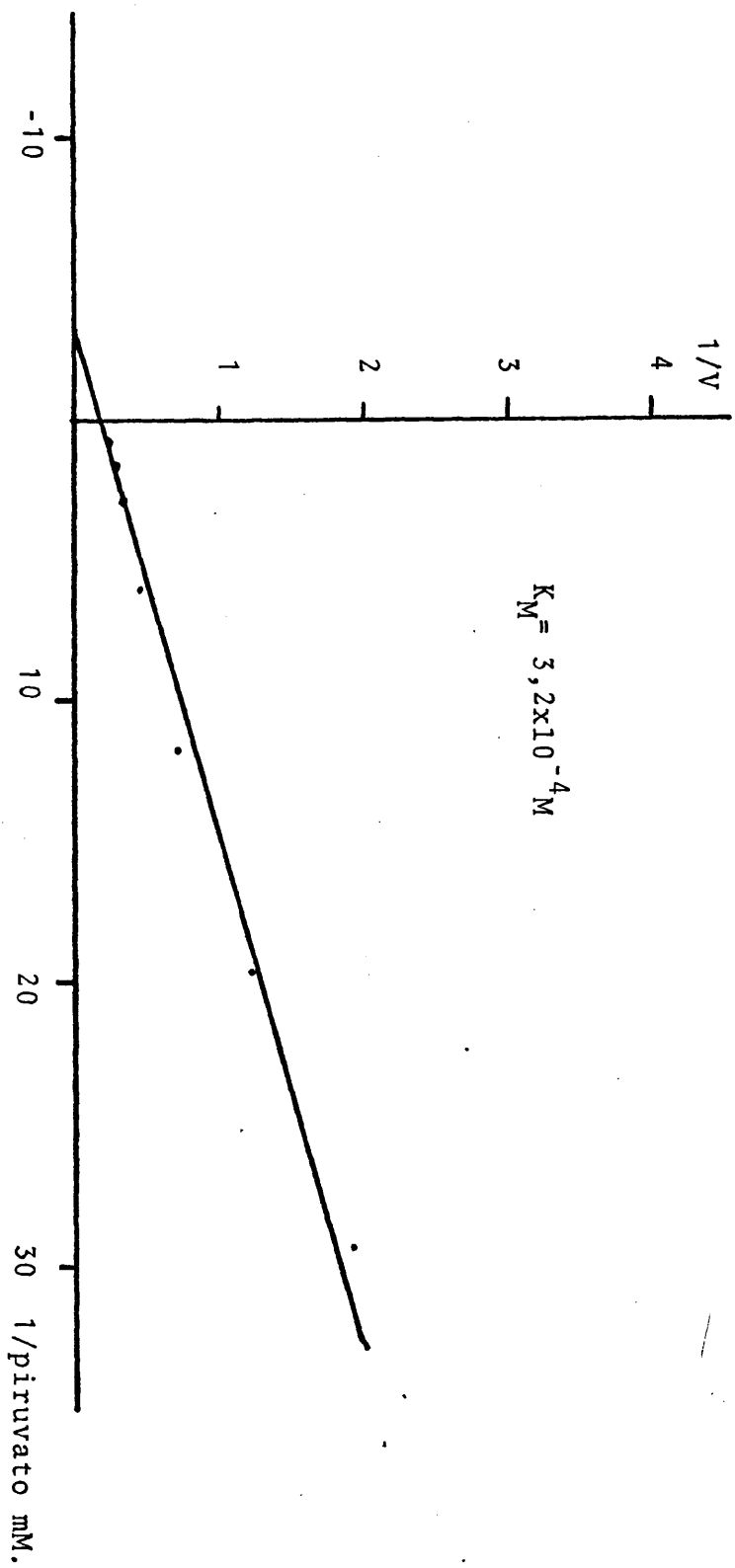


Fig. 4.- REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK DE LA LDH-5 DE FENOTIPO RAPIDO.

$V = \mu \text{ moles NADH/min.}/\text{mg. prot.}$



II CONSUMO DE OXIGENO EN RELACION CON LA TENSION DE OXIGENO AMBIENTE.

1.- Larvas no aclimatadas

Se utilizaron 72 larvas de una misma puesta en estado XVIII para medir el consumo de oxígeno frente a la tensión de oxígeno ambiente. Las larvas no se aclimataron previamente a las tensiones de oxígeno de medida. Se utilizaron los mismos animales para las medidas en larvas anestesiadas y no anestesiadas. En ambos casos, todas las medidas se realizaron a 20°C, y después de 24 horas de ayuno.

a) Larvas activas

En una primera serie de experimentos se midió el consumo de oxígeno, en animales con actividad normal, a seis tensiones de oxígeno distintas: 247 mmHg O₂; 150 mmHg O₂; 119 mmHg O₂; 90 mmHg O₂; 52 mmHg O₂; 35 mmHg O₂ (Tabla XIII). Se obtuvo un consumo de oxígeno similar en las larvas medidas a 247 y 150 mmHg O₂ al referir los resultados a peso húmedo y peso seco. El consumo de oxígeno por larva fue sin embargo mayor en el grupo medido a 247 mmHg de O₂ (132,5 µl) que en el grupo medido a 150 mmHg O₂ (115,9 µl) (0,025 < p < 0,05). El consumo de

T A B L A X I I I

CONSUMO DE OXIGENO EN LARVAS ACTIVAS MEDIDO A DISTINTAS TENSIONES DE OXIGENO. ESTADO XVIII. 20°C.

Tensión de O ₂ (mm Hg)	µl O ₂ /larva/h. (12)	µl O ₂ /mg.p.h./h. (12)	µl O ₂ /mg.p.s./h. (12)
247 mmHg	132,5 ⁺ 10,2 [*]	0,38 ⁺ 0,02	4,08 ⁺ 0,43
150 mmHg	115,9 ⁺ 3,0 ^{***}	0,33 ⁺ 0,04 ^{***}	3,98 ⁺ 0,36 ^{***}
119 mmHg	55,8 ⁺ 3,2	0,13 ⁺ 0,01	1,87 ⁺ 0,12
90 mmHg	58,0 ⁺ 6,5	0,14 ⁺ 0,03	1,81 ⁺ 0,23
52 mmHg	57,8 ⁺ 5,4 ^{***}	0,16 ⁺ 0,01 ^{***}	1,85 ⁺ 0,08 ^{***}
35 mmHg	25,0 ⁺ 4,3	0,07 ⁺ 0,01	0,81 ⁺ 0,07

-181-

() = número de larvas medidas en cada una de las tensiones de oxígeno. Los datos se expresan como la media ⁺ desviación típica. h. = hora; p.h. = peso húmedo; p.s. = peso seco. El análisis de varianza muestra diferencias significativas. Prueba de Scheffé: *dif.significativa (p<0,05); *** dif.significativa (p< 0,005). Los asteriscos muestran diferencias entre los datos entre los cuales están situados verticalmente en la tabla.

oxígeno por larva, por peso húmedo y por peso seco experimentó un descenso muy significativo ($p < 0,005$) al pasar de 150 mmHg O_2 a 119 mmHg O_2 . Hay un descenso aproximado del 50% en los tres casos (115,9 \rightarrow 55,8 $\mu l O_2$ /larva/h.; 0,33 \rightarrow 0,13 $\mu l O_2$ /mg.p.h./h. y 3,98 \rightarrow 1,87 $\mu l O_2$ /mg.p.s./h.). Entre las tensiones de O_2 de 119 mm Hg, 90mm Hg y 52 mmHg no hubo variaciones significativas en ninguno de los tres parámetros. El consumo de oxígeno se mantuvo en valores semejantes a los obtenidos a 119 mmHg O_2 en los dos grupos de tensión menor (90 y 52 mmHg O_2). Sin embargo, el último descenso de tensión de oxígeno ambiental desde 52 a 35 mm Hg (hipoxia extrema), supuso de nuevo un descenso marcado ($p < 0,005$) en los tres parámetros: 57,8 $\mu l O_2$ /larva/h. descendieron a 25,0 $\mu l O_2$ /larva/h., 0,16 $\mu l O_2$ /mg.p.h./h., pasaron a un valor de 0,07 $\mu l O_2$ /mg.p.h./h. y los 1,85 $\mu l O_2$ /mg.p.s./h. descendieron a 0,81 $\mu l O_2$ /mg.p.s./h. ($p < 0,005$). La relación entre el consumo en normoxia (150mmHg) y el consumo en hipoxia extrema (35 mmHg) es un valor cercano a cinco en los tres parámetros medidos.

b) Larvas anestesiadas

Las mismas larvas en las que se midió el consumo de oxígeno en actividad se utilizaron para medir el consu

mo de oxígeno en animales anestesiados. Los resultados aparecen en la tabla XIV y se expresan gráficamente en las figuras 6,7 y 8. Tanto el consumo de oxígeno por larva como los referidos a peso húmedo y peso seco experimentaron un descenso gradual a una tasa aproximadamente constante conforme la tensión de oxígeno de medida desciende desde 249 mmHg hasta 41 mmHg. La cantidad de oxígeno consumida por larva y por hora desciende desde 59,5 μ l hasta 3,2 μ l. En la figura 6, aparecen representados los puntos que relacionan el consumo de oxígeno/larva/h. con la tensión de oxígeno ambiental. A estos puntos se ajustó una recta de regresión por mínimos cuadrados cuya ecuación fue : $y = -17,14 + 0,3x$ y = consumo de oxígeno; x = tensión de O_2 de medida. El coeficiente de correlación r entre las dos variables fue 0,986 con un error típico de 0,096; r fue significativamente distinto de cero ($p < 0,005$).

El consumo de oxígeno por mg. peso húmedo/h. varió entre 0,169 y 0,009 μ l O_2 en las dos tensiones de O_2 de medida más extremas (249 y 41 mmHg). La recta ajustada a los puntos que relacionan las dos variables (fig. 7) tuvo por ecuación $y = -0,055 + 8,8 \cdot 10^{-4}x$. El coeficiente de correlación r fue 0,991 \pm 0,077 y significativamente distinto de cero ($p < 0,005$).

T A B L A X I V
CONSUMO DE OXIGENO EN LARVAS ANESTESIADAS, MEDIDO A DISTINTAS TENSIONES DE OXIGENO. ESTADO XVIII. 20°C.

Tensión de O ₂ (mm Hg)	µl O ₂ /larva/h. (12)	µl O ₂ /mg.p.h./h. (12)	µl O ₂ /mg.p.s./h. (12)
249 mm Hg	59,5 ± 4,5 ****	0,169 ± 0,017 ****	1,680 ± 0,100 ****
146 mm Hg	24,2 ± 3,2 **	0,069 ± 0,004 ****	0,835 ± 0,043 ****
122 mm Hg	17,8 ± 1,2 **	0,041 ± 0,003 ****	0,597 ± 0,067 ****
93 mm Hg	10,7 ± 1,6 *	0,027 ± 0,004 ****	0,334 ± 0,035 ****
63 mm Hg	4,0 ± 0,6	0,011 ± 0,001	0,128 ± 0,010
41 mm Hg	3,2 ± 0,9	0,009 ± 0,002	0,103 ± 0,018

() = número de larvas medidas en cada una de las tensiones de oxígeno. Los datos se expresan como la media ± desviación típica. h. = hora; p.h. = peso húmedo; p.s. = peso seco. El análisis de varianza muestra diferencias significativas. Prueba de Scheffé: * dif. significativa (p<0,05); ** dif. significativa (p<0,025); *** dif. significativa (p<0,005). Los asteriscos muestran diferencias entre los datos entre los cuales están situados verticalmente en la tabla.

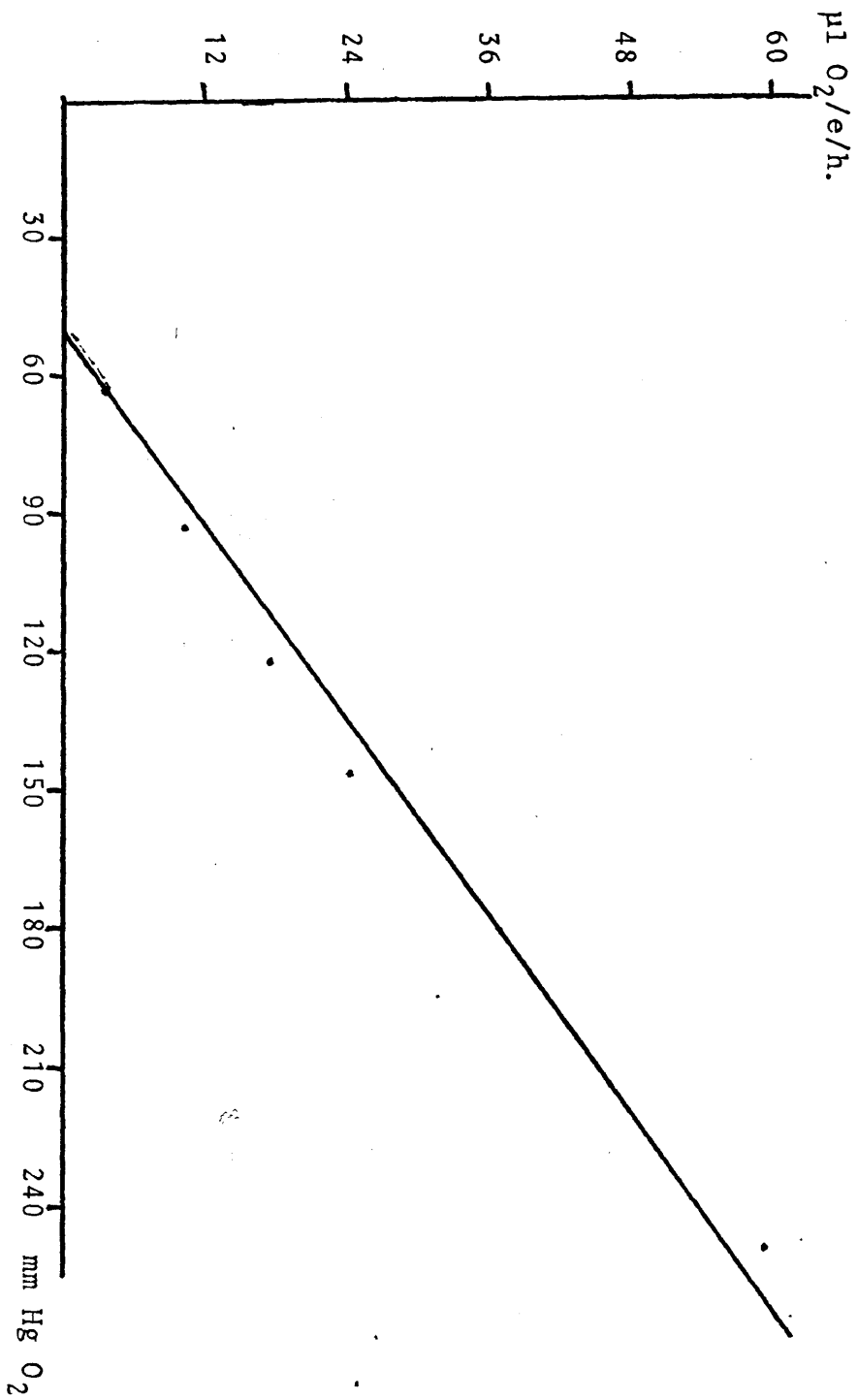


FIG. 6.- REGRESION LINEAL ENTRE CONSUMO DE OXIGENO POR EMBRION Y TENSION DE OXIGENO AMBIENTE. ANESTESIADOS. ESTADO XVIII.

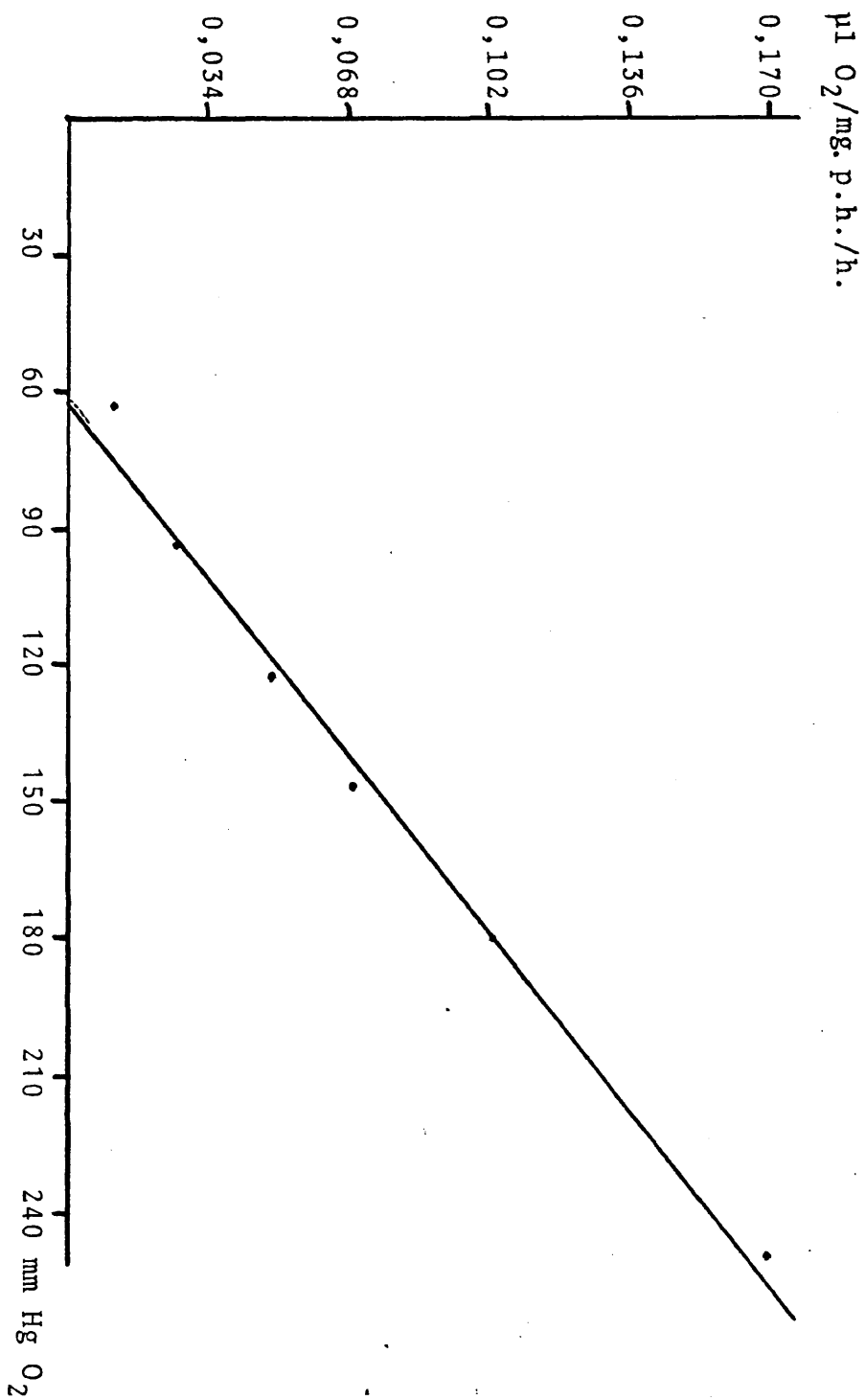


FIG. 7.- REGRESION LINEAL ENTRE CONSUMO DE OXIGENO POR PESO HUMEDO Y TENSION DE OXIGENO AMBIENTE. ANESTESIADOS. ESTADO XVIII.

En el caso del consumo de oxígeno por mg.peso seco/h. el valor varió entre 1,680 y 0,103 $\mu\text{l O}_2$ en las dos tensiones extremas, la recta fue $y = -0,429 + 8,5 \cdot 10^{-3}x$ (fig. 8), el coeficiente de correlación $0,999 \pm 0,026$ y significativamente distinto de cero ($p < 0,005$).

Como se puede apreciar en estos resultados, el ajuste de la recta a los puntos es mejor en la medida por mg. de peso húmedo que en la medida por larva y se hace aún mejor en la medida por peso seco. Consecuentemente con esto r se acerca cada vez más a uno y su error disminuye: $r = 0,986 \pm 0,096$ (por larva), $0,991 \pm 0,077$ (por mg.p.h.) y $0,999 \pm 0,026$ (por mg.p.s.). Si se estandarizan los resultados tomando como 100 el consumo de oxígeno medido a 249 mmHg de O_2 y expresando el resto de los valores en función de este máximo, se obtienen tres rectas con coeficientes de x muy similares: 0,51 para el consumo por larva, 0,52 para el consumo por mg. peso húmedo y 0,50 para el consumo por mg. peso seco.

Las tres medidas de consumo de oxígeno en normoxia (146 mmHg) en animales anestesiados (tabla XIV) presentan valores que no son significativamente diferentes de los obtenidos en hipoxia extrema (35 mmHg) en animales no anestesiados (tabla XIII). Así, los animales

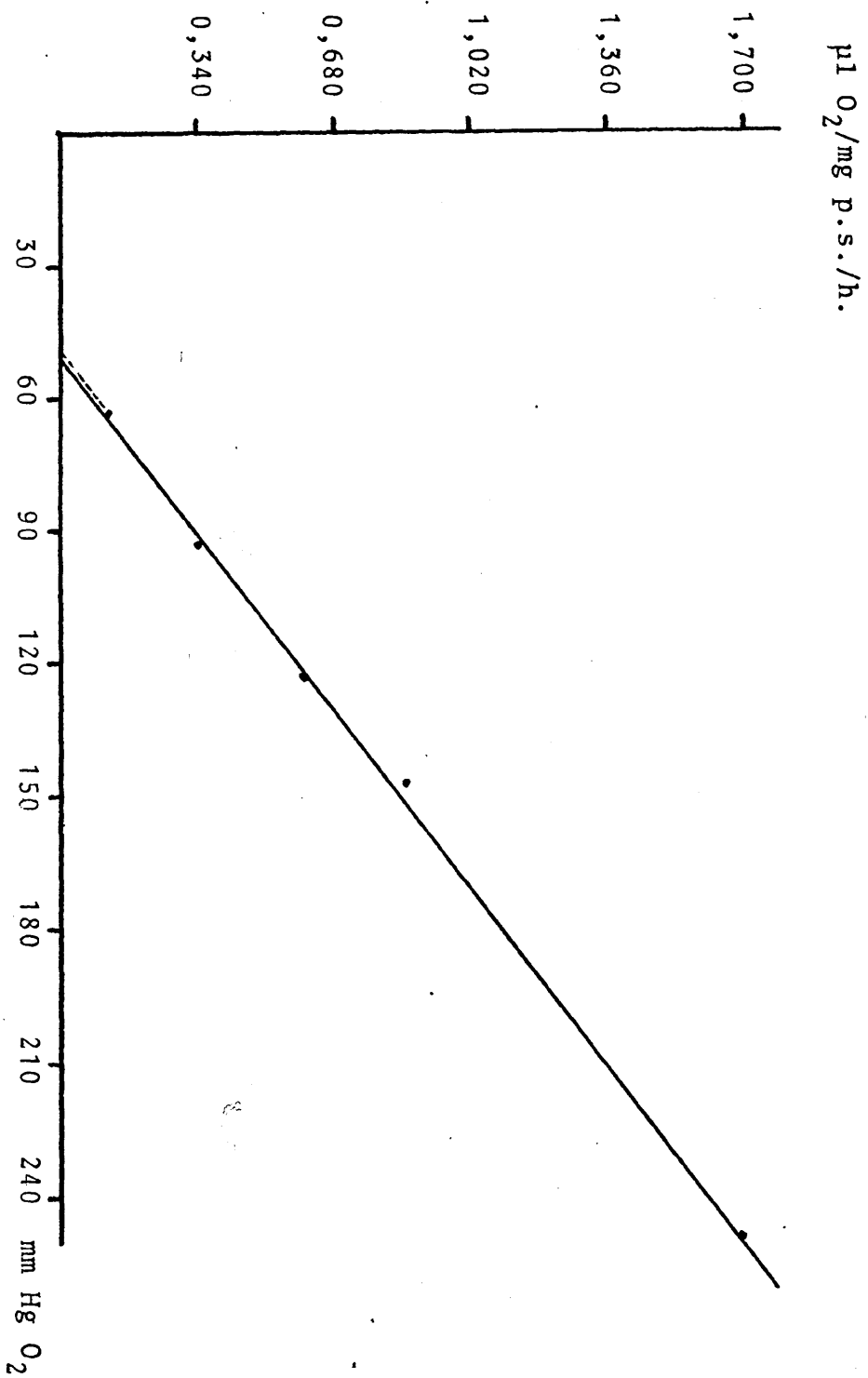


FIG. 8.- REGRESION LINEAL ENTRE CONSUMO DE OXIGENO POR PESO SECO Y TENSION DE OXIGENO AMBIENTE. ANESTESIADOS. ESTADO XVIII.

anestesiados y medidos a 146 mmHg O₂ muestran consumos de oxígeno de 24,2 µl O₂/larva/h., 0,07 µl O₂/mg.p.h./h. y 0,84 µl O₂/mg.p.s./h. mientras que las larvas no anestesiadas y medidas a 35 mmHg O₂ presentaban 25,0 µl O₂/larva/h., 0,07 µl O₂/mg.p.h./h. y 0,81 µl O₂/mg.p.s./h.

En las larvas anestesiadas, la relación entre el consumo de oxígeno en normoxia (146 mmHg O₂) y en hipoxia (41 mmHg O₂) fue del orden de ocho en los tres parámetros medidos. Los descensos observados en los tres parámetros conforme desciende la tensión de oxígeno de medida fueron estadísticamente significativos excepto en el paso de 63 a 41 mmHg O₂. Debido a esto, los valores obtenidos a esta última tensión de oxígeno (41 mmHg) no se incluyeron en las regresiones lineales. El nivel de significación fue alto ($p < 0,005$) en el resto de los casos excepto en el consumo de oxígeno/larva/h. que presentó una significación menor $0,01 < p < 0,025$ entre 146 y 93 mmHg O₂ y $0,025 < p < 0,05$ entre 93 y 63 mmHg O₂.

2.- Larvas aclimatadas.

Se midió el consumo de oxígeno por larva y por mg. de peso húmedo en larvas en estado XIV después de 14 días de aclimatación a la tensión de oxígeno de medida. Se utilizaron

tres grupos de 20 larvas cada uno. Dentro de cada grupo se hicieron cuatro subgrupos de cinco larvas cada uno que se utilizaron conjuntamente para medir el consumo de oxígeno. Los resultados, que aparecen en la tabla XV son similares en el consumo por larva y el consumo por peso húmedo. No hubo diferencias significativas entre los grupos de normoxia (149,1 mmHg O₂) e hiperoxia (710 mmHg O₂). El grupo de hipoxia extrema (37,3 mmHg O₂) mostró sin embargo un consumo mucho menor que el de los otros dos grupos ($p < 0,005$). La relación entre el consumo en condiciones de normoxia o hiperoxia y el consumo en hipoxia extrema fue del orden de seis : mientras que las larvas hipóxicas consumen 6,2 $\mu\text{l O}_2/\text{larva /h.}$ y 0,022 $\mu\text{l O}_2/\text{mg.p.h./h.}$, las normoxicas consumen 39,1 $\mu\text{l O}_2/\text{larva/h.}$ y 0,133 $\mu\text{l O}_2/\text{mg.p.h./h.}$, presentando las del grupo hiperóxico resultados similares a estos últimos (38,9 $\mu\text{l O}_2/\text{larva/h.}$ y 0,101 $\mu\text{l O}_2/\text{mg.p.h./h.}$). No se determinó el consumo de oxígeno por peso seco ya que las larvas utilizadas en este experimento se usaron también para la medida de la actividad relativa LDH. (Tablas XXII y XXIII).

T A B L A X V

CONSUMO DE OXIGENO EN LARVAS ACTIVAS ACLIMATADAS DURANTE CATORCE DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA EXTREMA, NORMOXIA E HIPEROXIA. ESTADO XIV. 20°C.

TENSION DE OXIGENO DURANTE LA MEDIDA:				
	HIPOXIA EXTREMA (20)	(a)	NORMOXIA (20)	HIPEROXIA (20) (b)
$\mu\text{l O}_2/\text{larva/h.}$	6,2 \pm 1,5	***	39,1 \pm 2,1	38,9 \pm 8,7 ***
$\mu\text{l O}_2/\text{mg p.h./h.}$	0,022 \pm 0,004	***	0,133 \pm 0,024	0,101 \pm 0,028***

-191-

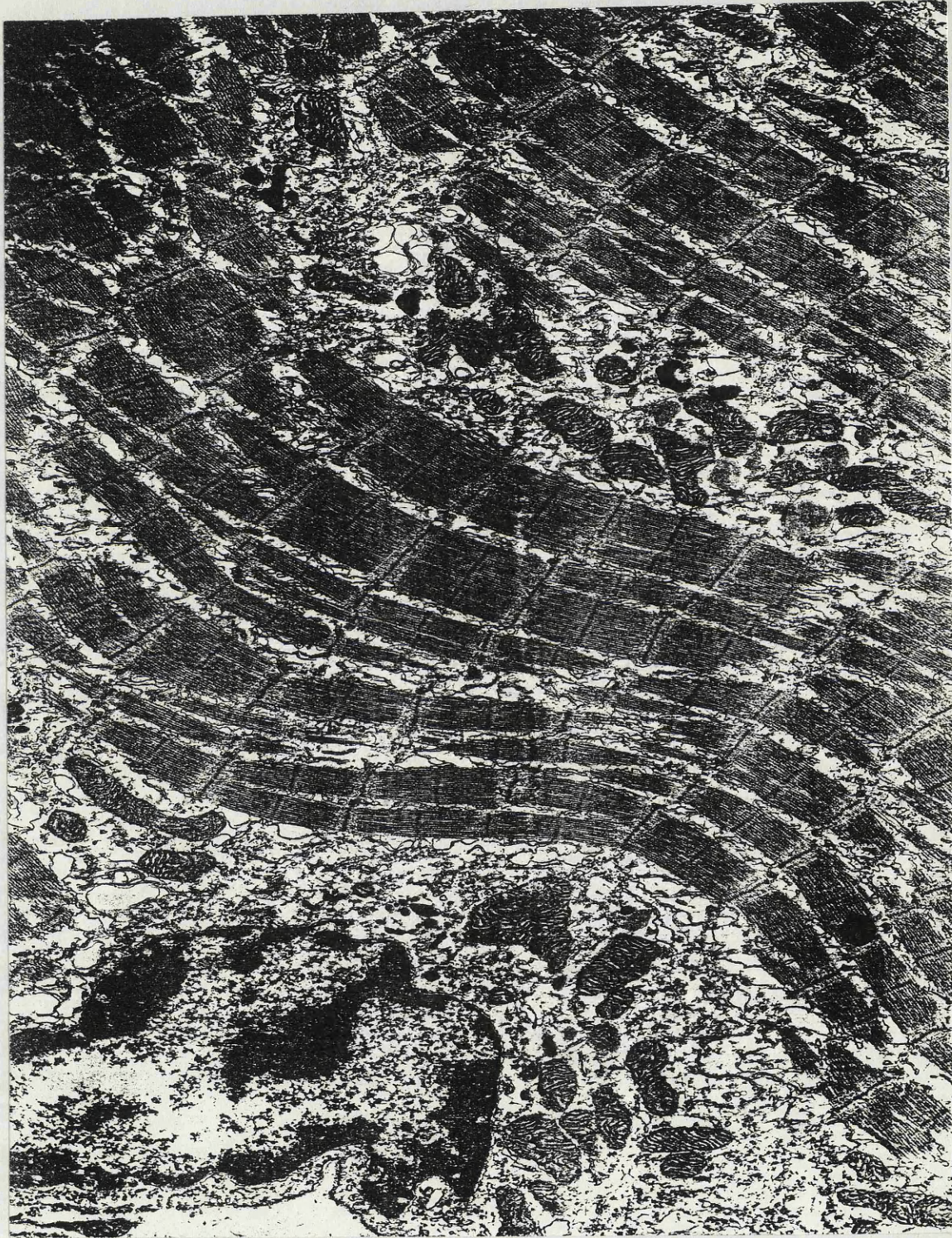
() = número de larvas por grupo. Los resultados se expresan como la media \pm desviación típica. h. = hora; p.h. = peso húmedo. El análisis de varianza muestra diferencias significativas. Prueba de Scheffé: *** diferencia significativa ($p < 0,005$).

(a) = comparación entre hipoxia extrema y normoxia; (b) = comparación entre hiperoxia e hipoxia extrema.

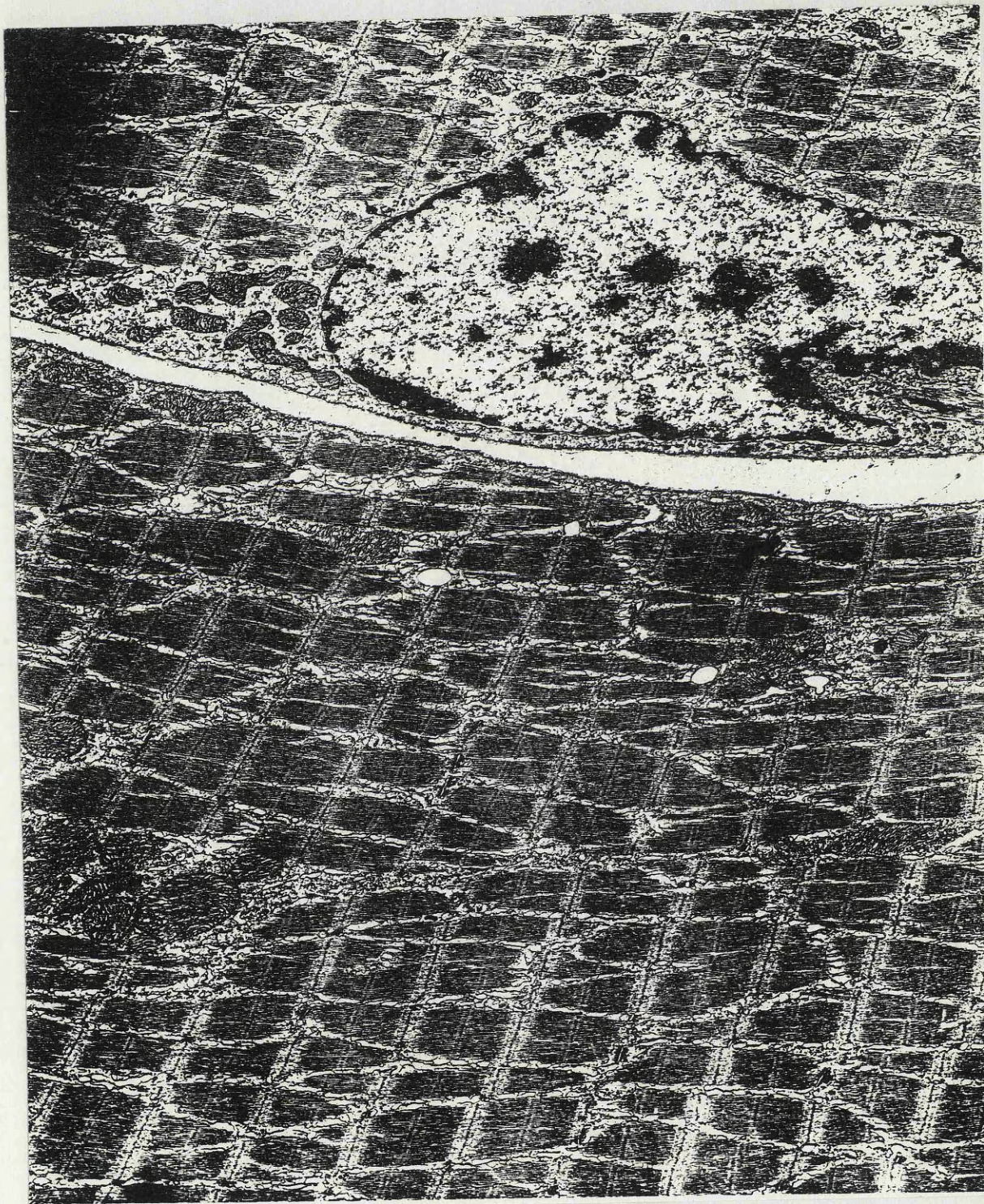
III EFECTO DE LA TENSION DE OXIGENO AMBIENTE SOBRE LA ULTRAESTRUCTURA DEL MUSCULO CAUDAL.

En las fotografías 1-10 aparece la ultraestructura del músculo caudal de *D. pictus* después de 15 días de aclimatación a condiciones de hipoxia extrema, normoxia e hiperoxia. Al final del período de aclimatación las larvas estaban en estado XIV. Se utilizaron dos larvas por cada grupo de tensión de oxígeno y el experimento se repitió dos veces obteniéndose en ambas el mismo resultado. Se utilizó la porción basal del músculo de la cola después de ser separado de la aleta caudal, en todos los casos.

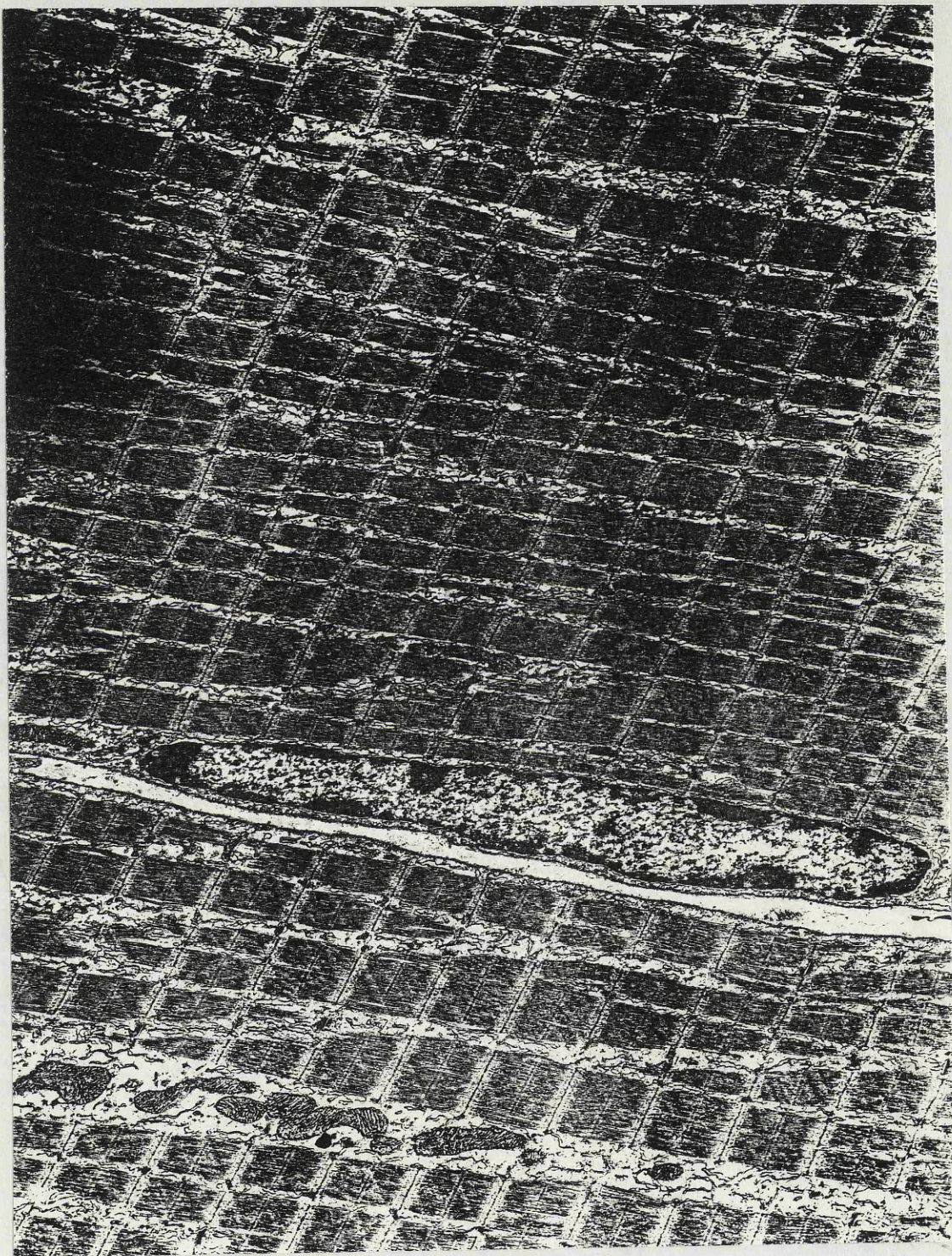
Se observa una estructura fibrilar en la disposición de las miofibrillas, que se encuentran delimitadas por el retículo sarcoplásmico, el cual está bien desarrollado. Las triadas aparecen a nivel de las líneas Z. El núcleo suele estar lateralizado y su forma es en general alargada y paralela al eje longitudinal de la fibra. Aparecen los componentes usuales en la sarcómera observándose claramente la banda M en el centro de la zona H. La línea Z realiza un zigzag de disposición regular. Las mitocondrias tienen gran contenido de crestas que se disponen también en zigzag. Todas estas características aparecen en los individuos del grupo normóxico (Fotogr.1,2 y 3). En el grupo de hipoxia extrema las mitocondrias conservan su aspecto normal, pero aparecen alteraciones en los sis-



Fotografía 1.- Normoxia. Músculo caudal. E.XIV.
x 18.000.



Fotografía 2.- Normoxia., Músculo caudal. E.XIV.
x 14.500.

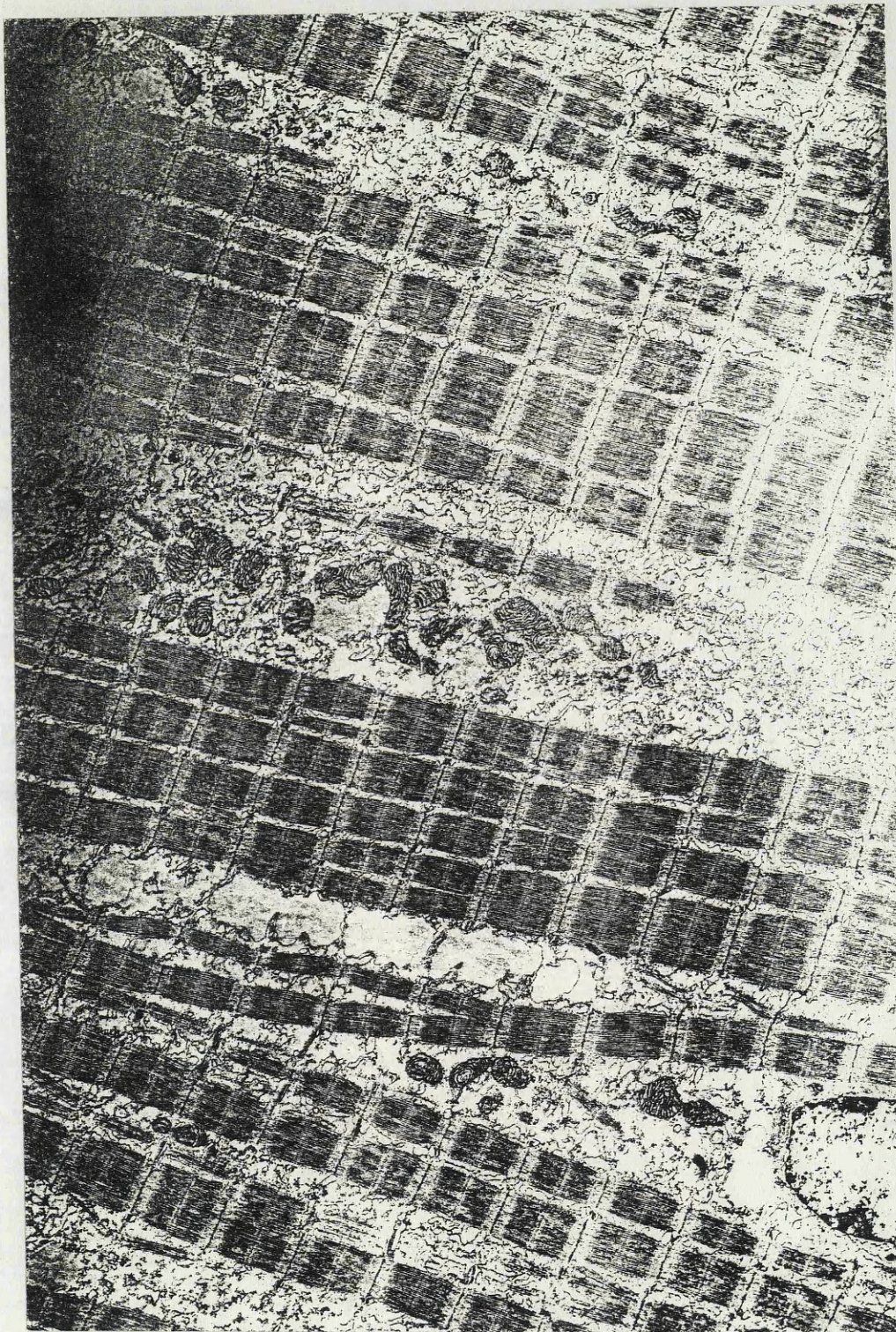


Fotografía 3.- Normoxia. Músculo caudal. E. XIV
x 12.000.

temas membranosos intracelulares. Se observa una hidropesía del retículo endoplásmico (fotogr. 4 y 5) así como un ensanchamiento irregular del espacio perinuclear que separa las membranas nucleares interna y externa (fotogr. 4 y 6). En el grupo de hiperoxia aparecen alteraciones muy significativas en las mitocondrias. Aparecen mitocondrias con la matriz vacuolizada, con pérdida de la densidad a los electrones, y las crestas retiradas en la zona periférica (fotogr. 7 y 8). Existen sin embargo mitocondrias prácticamente normales y mitocondrias en proceso de vacuolización (fotogr. 9 y 10). Las mitocondrias cuyo estado patológico es más avanzado presentan un tamaño mayor que las normales, alcanzando hasta 2,2 μ de largo y 1,0 μ de ancho (fotogr. 8).



Fotografía 4.- Hipoxia extrema. Músculo caudal. E. XIV
x 12.000.



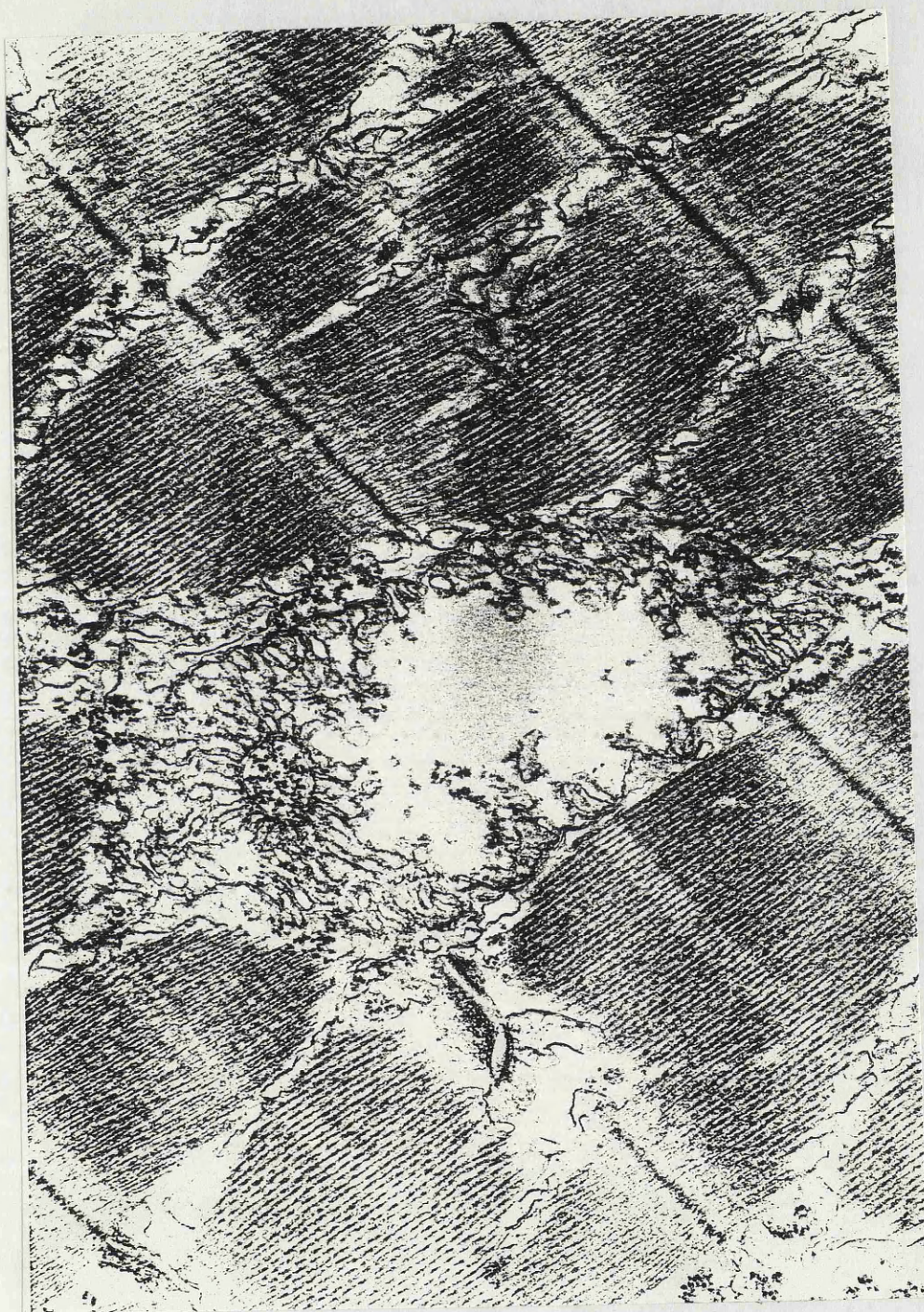
Fotografía 5.- Hipoxia extrema. Músculo caudal. E. XIV.
x 12.000.



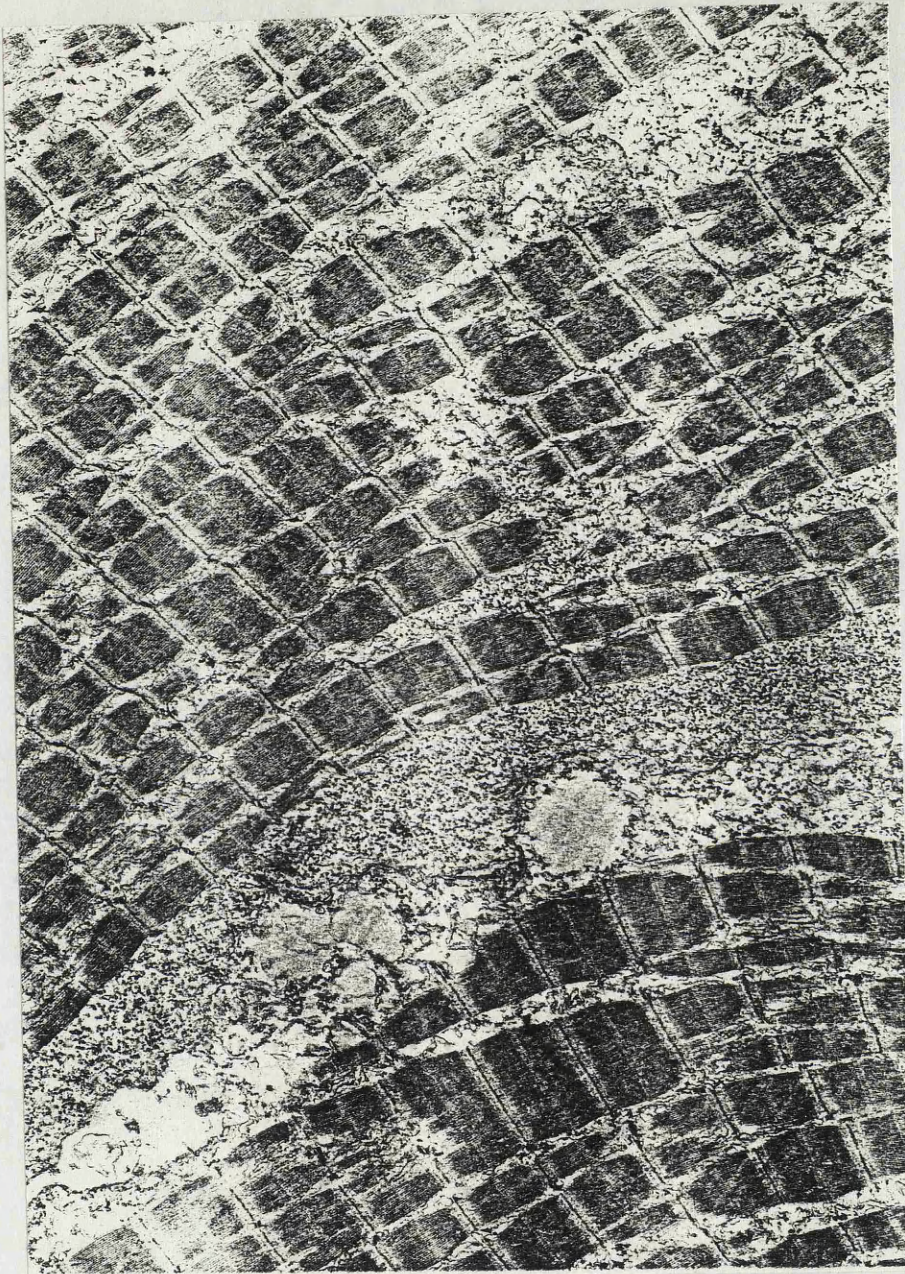
Fotografía 6.- Hipoxia Extrema. Músculo caudal. E. XIV
x 23.500.



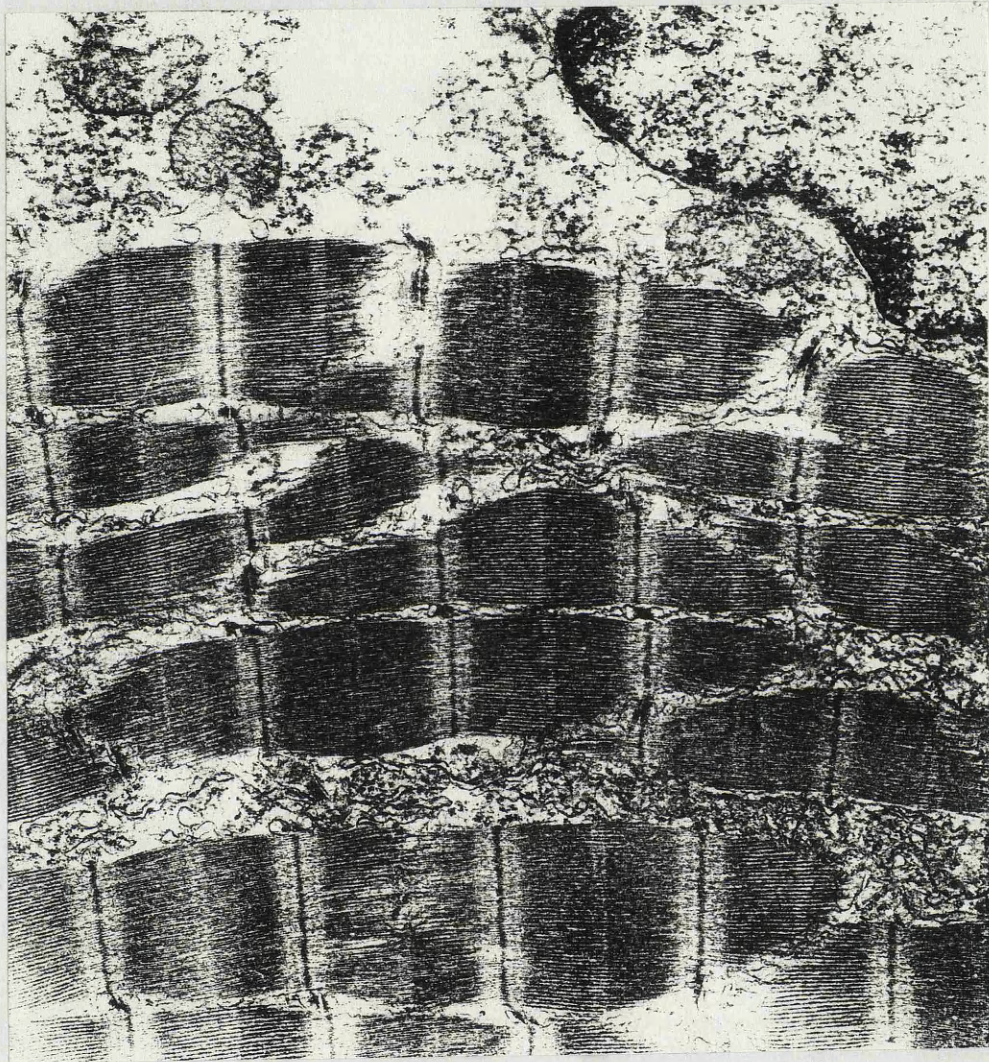
Fotografía 7.- Hiperoxia. Músculo caudal. E. XIV.
x 28.500.



Fotografía 8.- Hiperoxia. Músculo caudal. E. XIV.
x 55.000.



Fotografía 9.- Hiperoxa. Músculo caudal. E. XIV.
x 10.000.



Fotografía 10.- Hiperoxia. Músculo caudal. E. XIV.
x 23.500.

IV DIMENSIONES CORPORALES Y COMPORTAMIENTO EN LA ACLIMATACION A LA TENSION DE OXIGENO AMBIENTE.

1.- Longitudes y pesos.-

Se realizaron dos experimentos. En un primer experimento se aclimataron 16 larvas, 7 a hipoxia moderada (89,5 mmHg O_2) y 9 a normoxia, durante 15 días. El quinceavo día se midió la longitud total, la longitud céfalo-truncal, la longitud caudal, la anchura caudal máxima y el peso húmedo. Las larvas estaban en estado XIV. Los resultados, que aparecen en la tabla XVI no mostraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos. El grupo de hipoxia moderada presentó una longitud total de $32,7 \pm 2,0$ mm, una longitud céfalo-truncal de $12,5 \pm 0,9$ mm, una longitud caudal de $20,2 \pm 1,3$ mm, una anchura caudal máxima de $5,1 \pm 0,4$ mm y un peso húmedo de 310 ± 50 mg. En el caso del grupo normóxico estos parámetros fueron respectivamente $33,3 \pm 1,0$ mm, $12,6 \pm 0,7$ mm, $20,7 \pm 0,9$ mm, $5,1 \pm 0,2$ mm y 310 ± 20 mg. En estas mismas larvas se midió la actividad relativa LDH (Tabla XX).

En un segundo experimento se utilizaron tres grupos de 20 larvas cada uno. Un primer grupo se sometió a hipoxia extrema, un segundo a normoxia y un tercero a hiperoxia. Al final del período de aclimatación que duró 15 días, las larvas estaban en estado XIV. La tabla XVII resume

T A B L A X V I

LONTIGUTES Y PESO DE LARVAS DESPUES DE QUINCE DIAS
DE ACLIMATACION A CONDICIONES DE HIPOXIA MODERADA
Y NORMOXIA. ESTADO XIV.

	HIPOXIA MODERADA (7)	NORMOXIA (9)
LONG. TOTAL (mm)	32,7 \pm 2,0	33,3 \pm 1,0
CABEZA-TRONCO (mm)	12,5 \pm 0,9	12,6 \pm 0,7
COLA (mm)	20,2 \pm 1,3	20,7 \pm 0,9
ANCHURA MAX.COLA (mm)	5,1 \pm 0,4	5,1 \pm 0,2
PESO HUMEDO (mg)	310,0 \pm 50	310,0 \pm 20

() = número de larvas por grupo. Los resultados se expresan como
la media \pm desviación típica. No hay diferencias significativas.
Prueba t de Student ($p < 0,05$).

T A B L A X V I I

LONGITUDES Y PESO DE LARVAS DESPUES DE 15 DIAS DE ACLIMATACION A CONDICIONES DE HIPOXIA EXTREMA, NORMOXIA E HIPEROXIA. ESTADO XIV.

	HIPOXIA EXTREMA (20)	NORMOXIA (20)	(a)	HIPEROXIA (20)	(b)
LONG.TOTAL (mm)	29,1 ± 1,4	29,1 ± 1,6	***	34,0 ± 1,8	***
CABEZA-TRONCO (mm)	10,1 ± 0,7	11,2 ± 0,8	***	13,0 ± 1,0	***
COLA (mm)	19,0 ± 2,5	17,9 ± 1,9	***	21,0 ± 1,3	*
ANCHURA MAX. COLA (mm)	6,0 ± 0,7	5,7 ± 0,5	***	6,5 ± 0,5	***
PESO HUMEDO (mg)	280 ± 11	303 ± 65	***	385 ± 20	***

-206-

() = número de larvas por grupo. Los resultados se expresan como la media ± desviación típica. Los análisis de varianza muestran diferencias significativas. Prueba de Scheffé:
 * dif. significativa ($p < 0,05$); *** dif. significativa ($p < 0,01$); **** dif. significativa ($p < 0,005$).

(a) = comparación entre normoxia e hiperoxia; (b) = comparación entre hipoxia extrema e hiperoxia.

los resultados obtenidos. No se obtuvo ninguna diferencia significativa al comparar los grupos de hipoxia extrema y normoxia en ninguno de los parámetros de longitud ó anchura ni en el peso húmedo. Por el contrario, las larvas aclimatadas a la hiperoxia resultaron ser más grandes que las de los otros dos grupos. Así, el grupo hiperóxico tiene una longitud total media de 34,0 mm. cifra que es significativamente superior ($0,005 < p < 0,01$ en ambos casos) a los 29,1 mm. de los grupos normóxico y de hipoxia extrema. La longitud cefalotruncal fue de 10,1 mm. en el grupo de hipoxia extrema y 11,2 mm. en el grupo normóxico, cifras que son significativamente menores ($p < 0,005$ y $0,005 < p < 0,01$ respectivamente) que la del grupo hiperóxico, 13,0 mm. Lo mismo ocurrió con la longitud caudal que medía 21,0 mm. en las larvas hiperóxicas, mientras que fué menor en las normóxicas, 17,9 mm ($p < 0,005$) y en las hipóxicas, 19,0 mm ($0,0025 < p < 0,05$). La anchura máxima de la cola fue de 6,5 mm. en hiperoxia y significativamente menor en normoxia, 5,7 mm. ($p < 0,005$) y en hipoxia extrema, 6,0 mm ($p < 0,005$). El peso húmedo medio fué 280 mg en el grupo hipóxico y 303 mg. en el normóxico, ambos significativamente menores que el del grupo hiperóxico, 385 mg. ($p < 0,005$ en ambos casos).

Como resumen de ambos experimentos se puede decir que la aclimatación durante quince días a condiciones de hipoxia

extrema o moderada no altera el tamaño ni el peso de las larvas respecto al de larvas control (normoxia). La aclimatación a la hiperoxia durante quince días produce, sin embargo, un aumento significativo de todos los parámetros medidos de longitud y del peso.

2.- Comportamiento.-

Durante el desarrollo de todos los experimentos de aclimatación a la tensión de oxígeno ambiental se han realizado observaciones de visu referentes a las distintas reacciones comportamentales de las larvas. Se observó un comportamiento distinto en los diferentes grupos respecto al nivel de actividad y la ingestión de alimento. Mientras que las larvas aclimatadas a normoxia, hipoxia moderada e hiperoxia, mantenían una actividad espontánea que se podía clasificar como normal en estos animales, las larvas aclimatadas a hipoxia extrema mostraron una actividad espontánea muy reducida. Las larvas de este último grupo se mantenían prácticamente inmóviles con tendencia a flotar cerca de la superficie. Fue también más acusado en este grupo la toma de aire de la fase gaseosa. Las larvas de este grupo sólo mostraron respuesta motora ante la presencia de un estímulo externo (agitación, vibración o golpe brusco) de magnitud suficientemente elevada.

Se observaron también diferencias en la cantidad de ingestión de alimento ya que los animales de hiperoxia comían más por unidad de tiempo que los de normoxia, hipoxia moderada o hipoxia extrema. No hubo diferencias observables de visu entre estos tres últimos grupos.

V ACTIVIDADES DE LA LDH

1.- Actividades total y específica de la LDH en la aclimatación a la tensión de oxígeno ambiente.-

Se realizaron dos experimentos. En un primer experimento, que se resume en la tabla XVIII se aclimataron quince animales durante quince días, que es el período comprendido entre el inicio de la vida larvaria y el climax metamórfico. En el momento de preparar los extractos de animal completo, las larvas estaban en estado XII. Se aclimataron seis larvas a hipoxia extrema y nueve larvas a normoxia. La actividad total, que se expresa en μ moles de NADH oxidado por minuto y por larva presenta un valor de $4,35 \pm 0,9$ en hipoxia extrema y de $5,03 \pm 1,20$ en normoxia lo cual no supone la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos grupos. De la misma forma, la actividad específica de la LDH, expresada como μ moles de NADH oxidado por minuto y por miligramo de proteína no presentó tampoco diferencias significativas ($p < 0,05$) tomando un valor de $1,02 \pm 0,10$ en hipoxia extrema y $1,13 \pm 0,15$

T A B L A XVIII

ACTIVIDADES TOTAL Y ESPECIFICA DE LA LDH EN LARVAS ACLIMATADAS DURANTE QUINCE DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA EXTREMA Y NORMOXIA. ESTADO XII.

	HIPOXIA EXTREMA (6)	NORMOXIA (9)
ACT. TOTAL (μ moles NADH/ min./larva)	4,35 \pm 0,9	5,03 \pm 1,20
ACT. ESPEC. (μ moles NADH/ /min./mg. prot.)	1,02 \pm 0,10	1,13 \pm 0,15

() = número de larvas por grupo. Los resultados se expresan como la media \pm desviación típica. No hay diferencias significativas. Prueba t. ($p < 0,05$).

en normoxia.

La tabla XIX resume los resultados de un segundo experimento en el que se aclimataron durante quince días, siete larvas a condiciones de normoxia y ocho larvas a condiciones de hiperoxia. El quinceavo día de aclimatación se utilizaron las larvas en estado XVII para la preparación de extractos. La actividad total expresada en μ moles de NADH oxidados/min./larva pasó de un valor de $22,56 \pm 2,00$ en normoxia a $25,48 \pm 2,50$ en hiperoxia. Esta diferencia supone un aumento significativo de actividad total LDH en el grupo hiperóxico ($0,05 < p < 0,025$). La actividad específica medida en μ moles de NADH oxidados por minuto por miligramo de proteína no presentó sin embargo, variaciones significativas ($p < 0,05$) entre los dos grupos, presentando un valor de $3,01 \pm 0,34$ en normoxia y de $2,95 \pm 0,39$ en hiperoxia.

2.- Actividad relativa de las isoenzimas LDH en la aclimatación a la tensión de oxígeno ambiente.-

Se realizaron cuatro experimentos con individuos de fenotipo LDH rápido.

a) Experimento 1.

En la tabla XX y figuras 9 y 10, aparece el modelo de

T A B L A X I X

ACTIVIDADES TOTAL Y ESPECIFICA DE LA LDH EN LARVAS ADAPTADAS DURANTE QUINCE DIAS A CONDICIONES DE NORMOXIA E HIPEROXIA. ESTADO XVII.

	NORMOXIA (7)		HIPEROXIA (8)
ACT. TOTAL (μ moles NADH/ /min./larva)	22,56 \pm 2,00	**	25,48 \pm 2,50
ACT.ESPEC. (μ moles NADH/ /min./mg.prot.)	3,01 \pm 0,34		2,95 \pm 0,39

() = número de larvas por grupo. Los resultados se expresan como la media \pm desviación típica. Prueba t: ** diferencia significativa ($p < 0,025$).

T A B L A X X

ACTIVIDAD RELATIVA DE LAS ISOENZIMAS LDH EN LARVAS ADAPTADAS DURANTE QUINCE DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA MODERADA Y NORMOXIA. ESTADO XIV. FENOTIPO RAPIDO.

ISOENZIMAS	HIPOXIA MODERADA (7)	NORMOXIA (9)
LDH 1	23,6 \pm 2,3	22,7 \pm 3,4
LDH 2	13,4 \pm 2,6	11,6 \pm 2,2
LDH 3	16,0 \pm 1,6	14,6 \pm 1,6
LDH 4	18,9 \pm 1,4	18,9 \pm 1,1
LDH 5	28,1 \pm 4,7	32,2 \pm 5,4

SUBUNIDADES

H	46,4 \pm 4,1	43,4 \pm 4,3
M	53,6 \pm 4,1	56,6 \pm 4,3
M/H	1,2 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2

() = número de extractos medidos por grupo.

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm desviación típica.

No hay cambios significativos. Prueba t. $p < 0.05$.

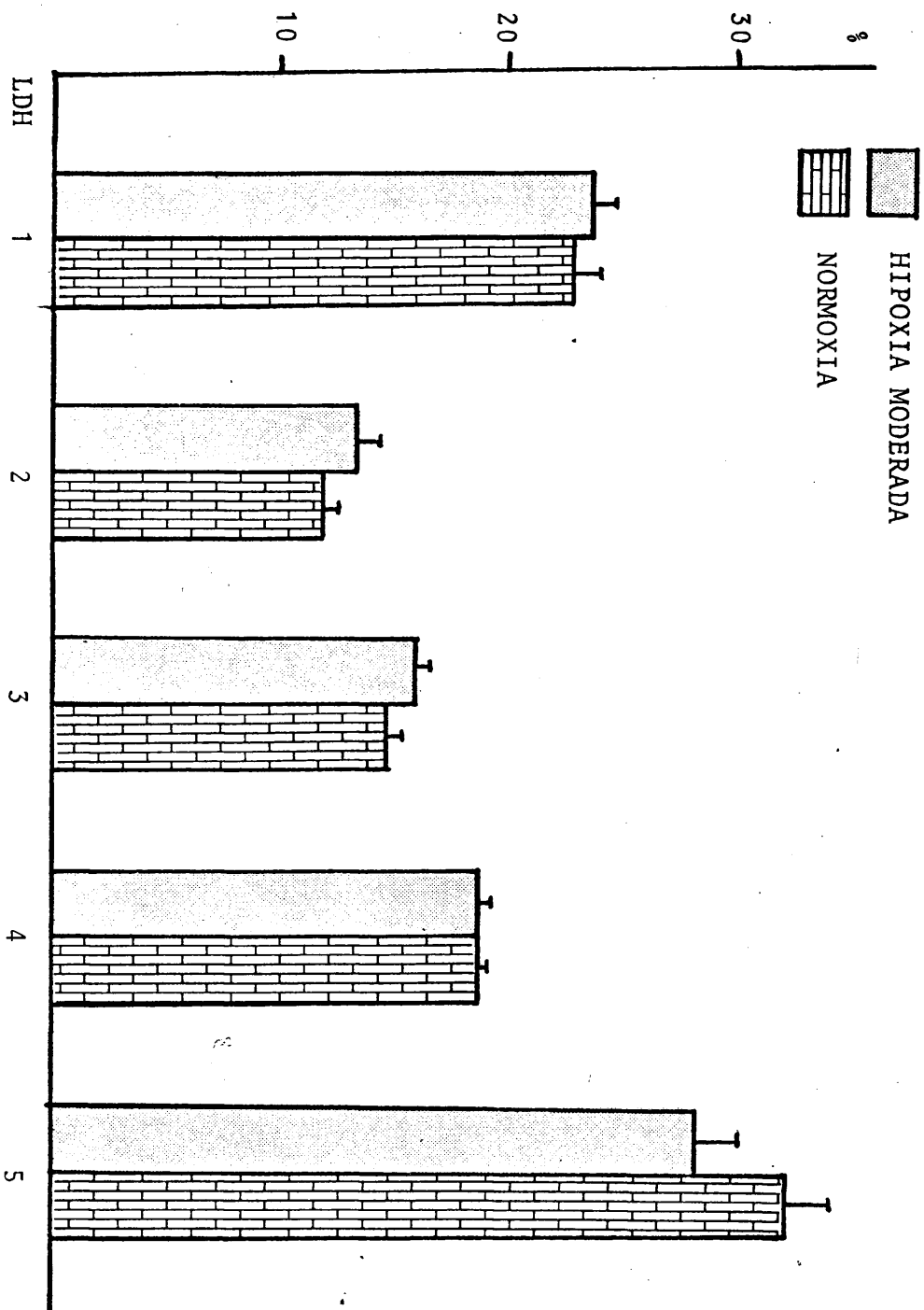


FIG. 9.- REPRESENTACION GRAFICA DE LAS ACTIVIDADES RELATIVAS LDH EN LARVAS ADAPTADAS DURANTE 15 DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA MODERADA Y NORMOXIA. ESTADO XIV.

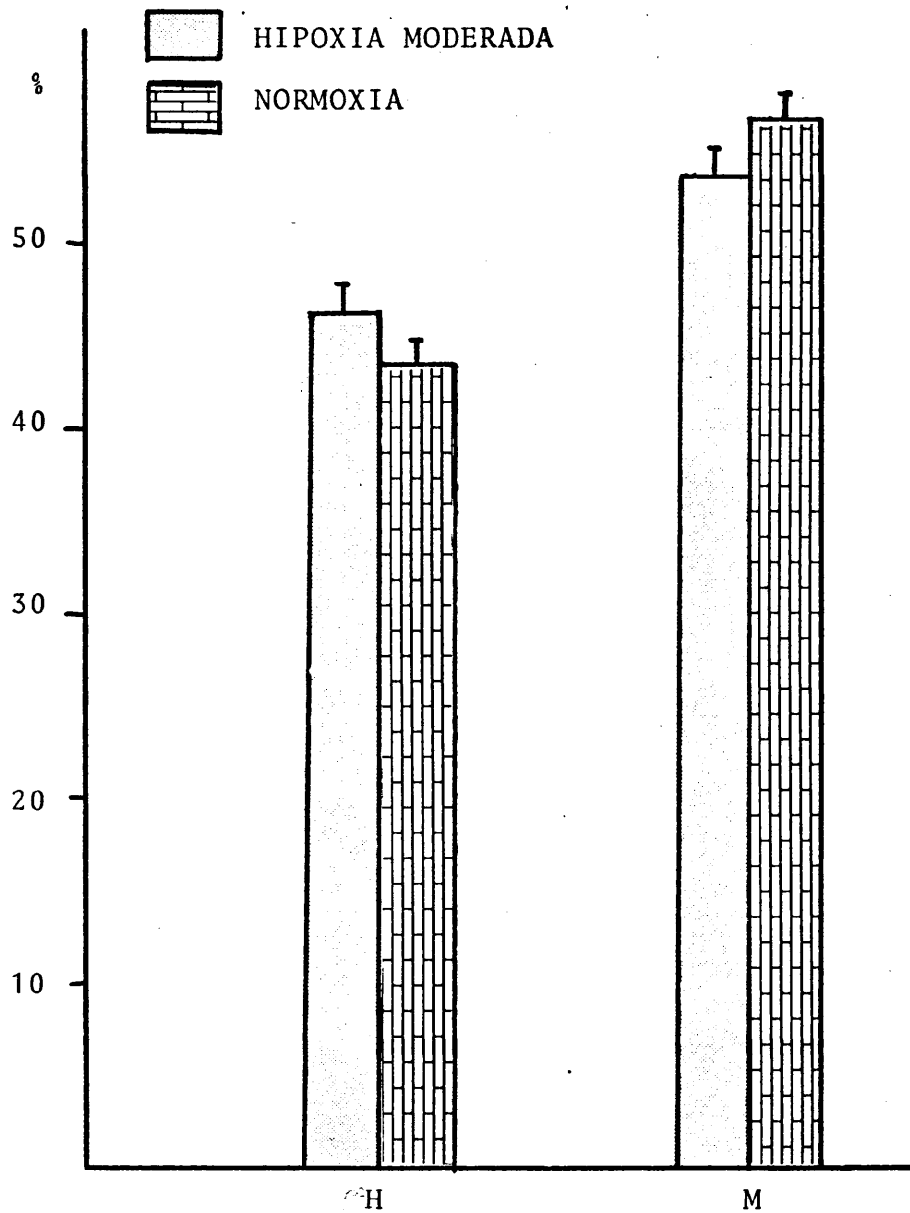


FIG. 10.- REPRESENTACION GRAFICA DEL % DE SUBUNIDADES H Y M EN LARVAS ADAPTADAS DURANTE 15 DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA MODERADA Y NORMOXIA. ESTADO XIV.

isoenzimas y subunidades de la LDH en extractos de animal completo. Se aclimataron durante quince días siete animales a hipoxia moderada y nueve a normoxia. El modelo de isoenzimas muestra un patrón intermedio de subunidades M y H en el estado XIV: 43,4% para las subunidades H y 56,6 % para las subunidades M en el grupo normóxico. No se registraron cambios significativos ($p < 0,05$) en ninguna de las isoenzimas ni en las subunidades. El orden de actividad relativa de mayor a menor fue LDH 5 > LDH 1 > LDH 4 > LDH 3 > LDH 2.

b) Experimento 2.

En este segundo experimento se aclimataron 14 larvas a hipoxia moderada y 14 larvas más a normoxia. Después de los quince días correspondientes al período de aclimatación se prepararon extractos de hígado completo procedentes de las larvas en estado XXV (2 hígados por extracto), los cuales se utilizaron para la determinación de la actividad relativa de las isoenzimas y subunidades. Los resultados, que se muestran en la tabla XXI y en las figuras 11 y 12 muestran un aumento de la LDH 5 y de las subunidades M así como un pequeño descenso del resto de las isoenzimas en el grupo de hipoxia moderada respecto al de normoxia. Estas variaciones, sin embargo, no resultaron ser significativas en ninguno de los casos expuestos ($p < 0,05$). El

T A B L A XXI

ACTIVIDAD RELATIVA DE LAS ISOENZIMAS LDH EN EL HIGADO DE LARVAS ADAPTADAS DURANTE QUINCE DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA MODERADA Y NORMOXIA. ESTADO XXV. FENOTIPO RAPIDO.

ISOENZIMAS	HIPOXIA MODERADA (7)	NORMOXIA (7)
LDH 1	9,4 \pm 1,2	10,1 \pm 1,2
LDH 2	8,5 \pm 1,4	9,2 \pm 0,9
LDH 3	13,6 \pm 2,3	14,9 \pm 1,4
LDH 4	20,1 \pm 2,4	22,0 \pm 2,0
LDH 5	48,3 \pm 5,3	43,8 \pm 4,5
SUBUNIDADES		
H	27,7 \pm 3,0	29,9 \pm 2,1
M	72,3 \pm 3,0	70,1 \pm 2,1
M/H	2,6 \pm 0,4	2,3 \pm 0,3

() = número de extractos de hígado por grupo. 2 hígados completos por extracto.

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm desviación típica.

No hay diferencias significativas. Prueba t. $p < 0.05$

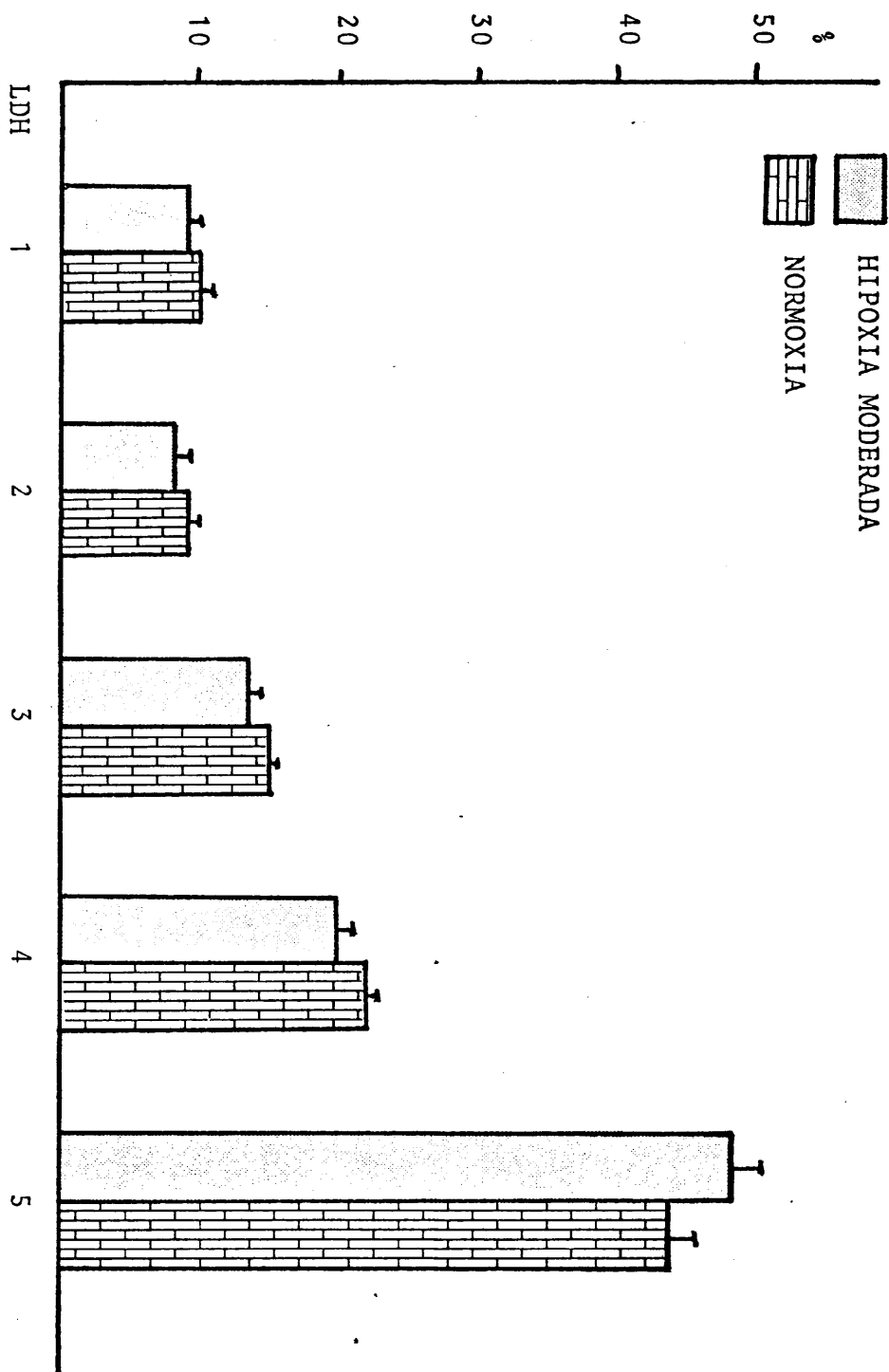


FIG. 11.- REPRESENTACION GRAFICA DE LAS ACTIVIDADES RELATIVAS LDH EN EL HI-
GADO DE LARVAS ADAPTADAS DURANTE 15 DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA MODERADA
Y NORMOXIA. ESTADO XXV.

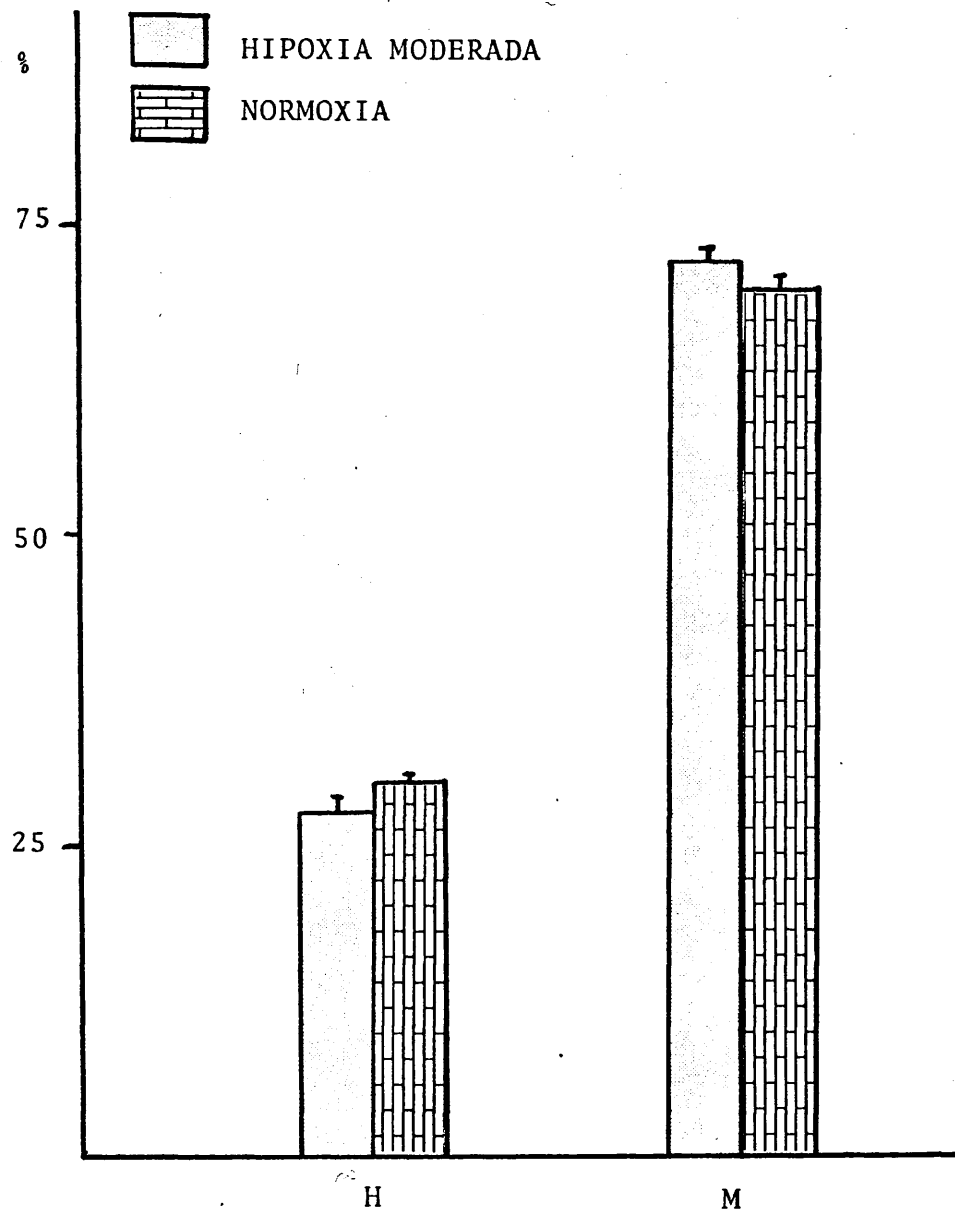


FIG.12.- REPRESENTACION GRAFICA DEL % DE SUBUNIDADES H Y M EN EL HIGADO DE LARVAS ADAPTADAS DURANTE 15 DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA MODERADA Y NORMOXIA. ESTADO XXV.

patrón de isoenzimas presentó un predominio claro de las isoenzimas compuestas por subunidades M. Así, el grupo normóxico presentó un 70,1 y el de hipoxia moderada un 72,3 % de subunidades M. La isoenzima LDH 2 fue la que presentó el valor más bajo en ambos grupos.

c) Experimento 3.

Se realizó un nuevo experimento de aclimatación, esta vez a tres tensiones de oxígeno diferentes. Un primer grupo de 12 larvas estuvo sometido a hipoxia extrema, un segundo compuesto por 16 larvas sometidas a normoxia y el tercer grupo también de 16 larvas se aclimató a hiperoxia. El tiempo de aclimatación fue de quince días, al final de los cuales se prepararon extractos con dos hígados completos cada uno. Las larvas se encontraban en estado XIV. Los resultados se expresan en la tabla XXII y se representan gráficamente en las figuras 13 y 14.

Al comparar el grupo de hipoxia extrema con respecto al de normoxia se encontraron las siguientes variaciones: a) un aumento significativo de la isoenzima LDH 5 ($p < 0,005$) de 48,2 a 60,8%; un aumento de las subunidades de tipo M ($0,01 < p < 0,025$) de 76,8 a 81,7 %; y un aumento de la relación subunidades M/subunidades H ($p < 0,005$) de 3,3 a 4,6 (39% de aumento); b) Hubo ade-

T A B L A XXII

ACTIVIDAD RELATIVA DE LAS ISOENZIMAS LDH EN EL HIGADO DE LARVAS ADAPTADAS DURANTE QUINCE DÍAS A CONDICIONES DE HIPOXIA EXTREMA, NORMOXIA E HIPEROXIA, ESTADO XIV. FENOTIPO RAPIDO.

ISOENZIMAS	HIPOXIA EXTREMA (6)	(a)	NORMOXIA (8)	HIPEROXIA (8)	(b)
LDH-1	4,0 ± 1,1		4,4 ± 0,9	4,9 ± 0,6	
LDH-2	1,4 ± 0,9	****	6,0 ± 1,4	7,3 ± 1,1	****
LDH-3	16,3 ± 2,9		15,9 ± 3,4	15,9 ± 2,2	
LDH-4	17,5 ± 2,5	****	25,5 ± 1,9	27,6 ± 2,9	****
LDH-5	60,8 ± 4,6	****	48,2 ± 5,3	44,3 ± 4,0	****
SUBUNIDADES					
M	81,7 ± 2,9	***	76,8 ± 2,8	74,8 ± 1,4	***
H	18,3 ± 2,9	***	23,2 ± 2,8	25,2 ± 1,4	***
M/H	4,6 ± 0,6	***	3,3 ± 0,5	3,0 ± 0,2	***

() = número de extractos de hígado. Número de hígados completos por extracto=2. Los resultados se expresan como la media ± desviación típica. Los análisis de varianza muestran diferencias significativas. Prueba de Scheffé: *** diferencia significativa ($p < 0,01$); **** diferencia significativa ($p < 0,005$). (a) = comparación entre hipoxia extrema y normoxia. (b) = comparación entre hipoxia extrema e hiperoxia.

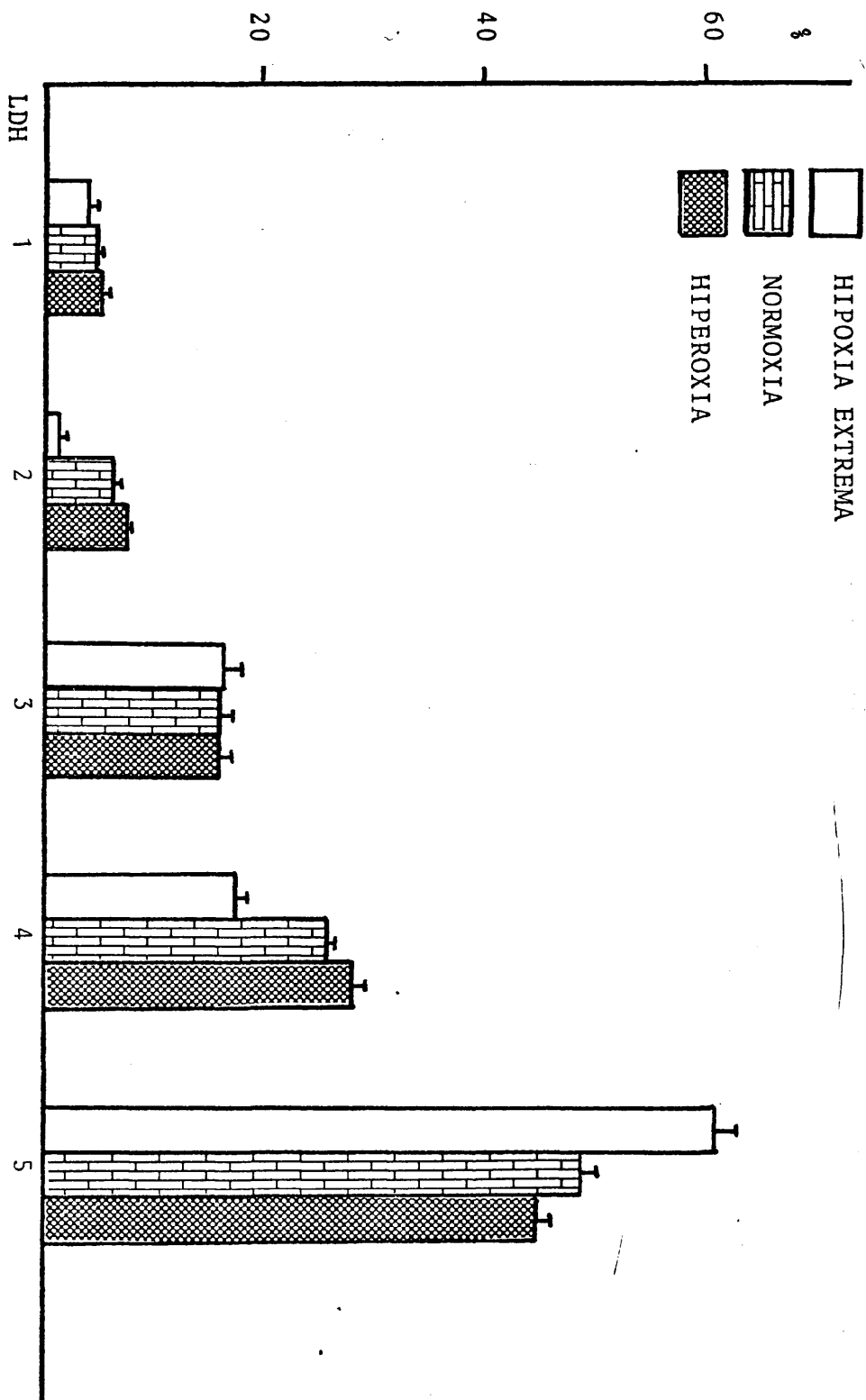


FIG.13.- REPRESENTACION GRAFICA DE LAS ACTIVIDADES RELATIVAS LDH EN EL HIGADO DE LARVAS ADAPTADAS DURANTE 15 DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA EXTREMA, NORMOXIA E HIPEROXIA. ESTADO XIV.

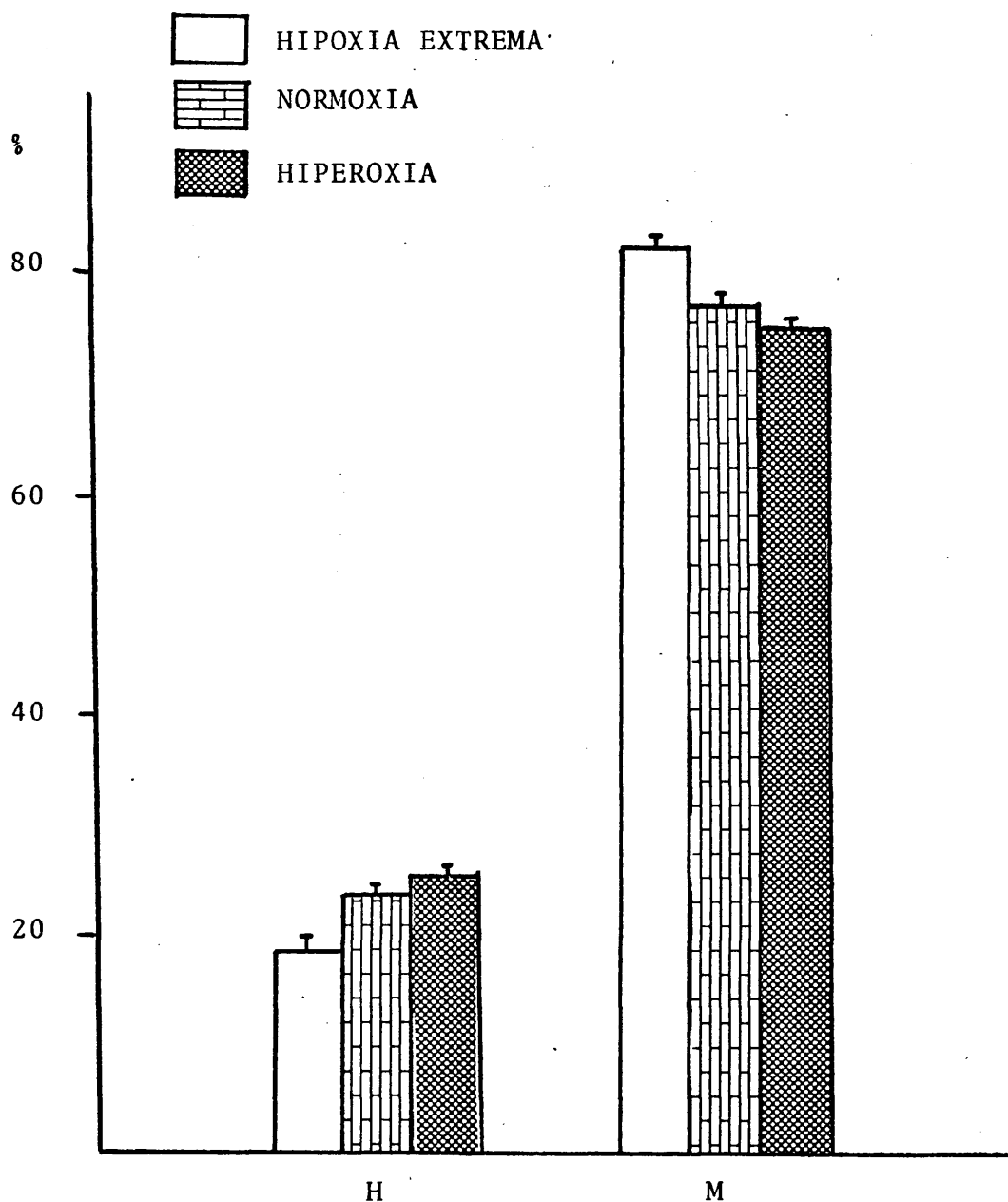


FIG. 14.- REPRESENTACION GRAFICA DEL % DE SUBUNIDADES H Y M EN EL HIGADO DE LARVAS ADAPTADAS DURANTE 15 DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA EXTREMA, NORMOXIA E HIPEROXIA. ESTADO XIV.

más un descenso significativo de las isoenzimas LDH 2 ($p < 0,005$) de 6,0 a 1,4 %; y LDH 4 ($p < 0,005$) de 25,5 a 17,5 %.

El grupo de hiperoxia presentó un aumento de las isoenzimas LDH 1, LDH 2 y LDH 4 así como un descenso de la LDH 5, las subunidades M y la relación M/H, con respecto a las larvas normóxicas. Estas variaciones no fueron sin embargo, estadísticamente significativas en ninguno de los casos ($p < 0,05$).

Cuando se compararon los resultados obtenidos en los grupos de hipoxia extrema e hiperoxia se observó: a) un valor significativamente más alto en el grupo de hipoxia extrema de la isoenzima LDH 5 ($p < 0,005$) de 44,3 a 60,8 %; de las subunidades de tipo M ($0,005 < p < 0,01$) de 74,8 a 81,7 %; y de la relación M/H ($p < 0,005$) de 3,0 a 4,6; b) un valor significativamente más bajo en el grupo de hipoxia extrema de las isoenzimas LDH 2 ($p < 0,005$) de 7,3 a 1,4 %; y LDH 4 ($p < 0,005$) de 27,6 a 17,5 %.

En resumen, y tomando los resultados conjuntamente, se observó que: a) la isoenzima LDH 2 presentó siempre el coeficiente de variación más alto (15-64%); b) la isoenzima LDH 5 presentó siempre el valor más alto; c) que los cambios observados en las tres comparaciones son pa

rales de forma que a medida que desciende la tensión de oxígeno de aclimatación van aumentando la LDH 5, las subunidades M y la relación M/H, y van disminuyendo las isoenzimas LDH 2 y LDH 4 (Fíg. 13 y 14); d) los cambios son más marcados entre hipoxia e hiperoxia, suponiendo en este caso un 37% de aumento de la LDH 5, y un 53% de aumento de la relación M/H.

d) Experimento 4.

En este cuarto experimento se midió la actividad relativa de las isoenzimas LDH y las subunidades H y M en extractos procedentes del músculo caudal completo. Las larvas utilizadas fueron las mismas del experimento nº3 y el tiempo de aclimatación quince días. Los resultados se expresan en la tabla XXIII y su representación gráfica aparece en las figuras 15 y 16.

El grupo aclimatado a hipoxia extrema mostró con respecto al de normoxia los siguientes cambios: a) un aumento significativo de las isoenzimas LDH 2 ($p < 0,005$) de 5,4 a 10,0%; y LDH 3 ($0,005 < p < 0,01$) de 12,4 a 16,5%; b) un descenso significativo de la isoenzima LDH 5 ($0,005 < p < 0,01$) de 41,6 a 33,2%; de las subunidades de tipo M ($0,005 < p < 0,01$) de 68,1 a 61,5; y de

T A B L A XXIII

ACTIVIDAD RELATIVA DE LAS ISOENZIMAS LDH EN EL MUSCULO CAUDAL DE LARVAS ADAPTADAS DURANTE QUINCE DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA EXTREMA, NORMOXIA E HIPOXIA. ESTADO XIV. FENOTIPO RAPIDO.

ISOENZIMAS	HIPOXIA EXTREMA (8)	(a)	NORMOXIA (8)	HIPOXIA (8)	(b)
LDH 1	17,0 ± 4,0		15,4 ± 1,6	15,7 ± 4,6	
LDH 2	10,0 ± 2,4	****	5,4 ± 1,1	6,2 ± 2,3	****
LDH 3	16,5 ± 2,4	***	12,4 ± 1,2	13,6 ± 3,0	*
LDH 4	23,3 ± 1,8		25,2 ± 2,7	26,0 ± 2,4	*
LDH 5	33,2 ± 4,9	***	41,6 ± 2,8	38,5 ± 4,6	*
SUBUNIDADES					
M	61,5 ± 4,8	***	68,1 ± 2,0	66,1 ± 4,2	*
H	38,5 ± 4,8	***	31,9 ± 2,0	33,9 ± 4,2	*
M/H	1,6 ± 0,3	***	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,4	*

() = número de colas por grupo. Los resultados se expresan como la media ± desviación típica. El análisis de varianza muestra diferencias significativas excepto en la isoenzima LDH 1. Prueba de Scheffé: * diferencia significativa ($p < 0.05$); *** diferencia significativa ($p < 0.01$); **** diferencia significativa ($p < 0.005$).
(a) = comparación entre hipoxia extrema y normoxia; (b) = comparación entre hipoxia extrema e hiperoxia.

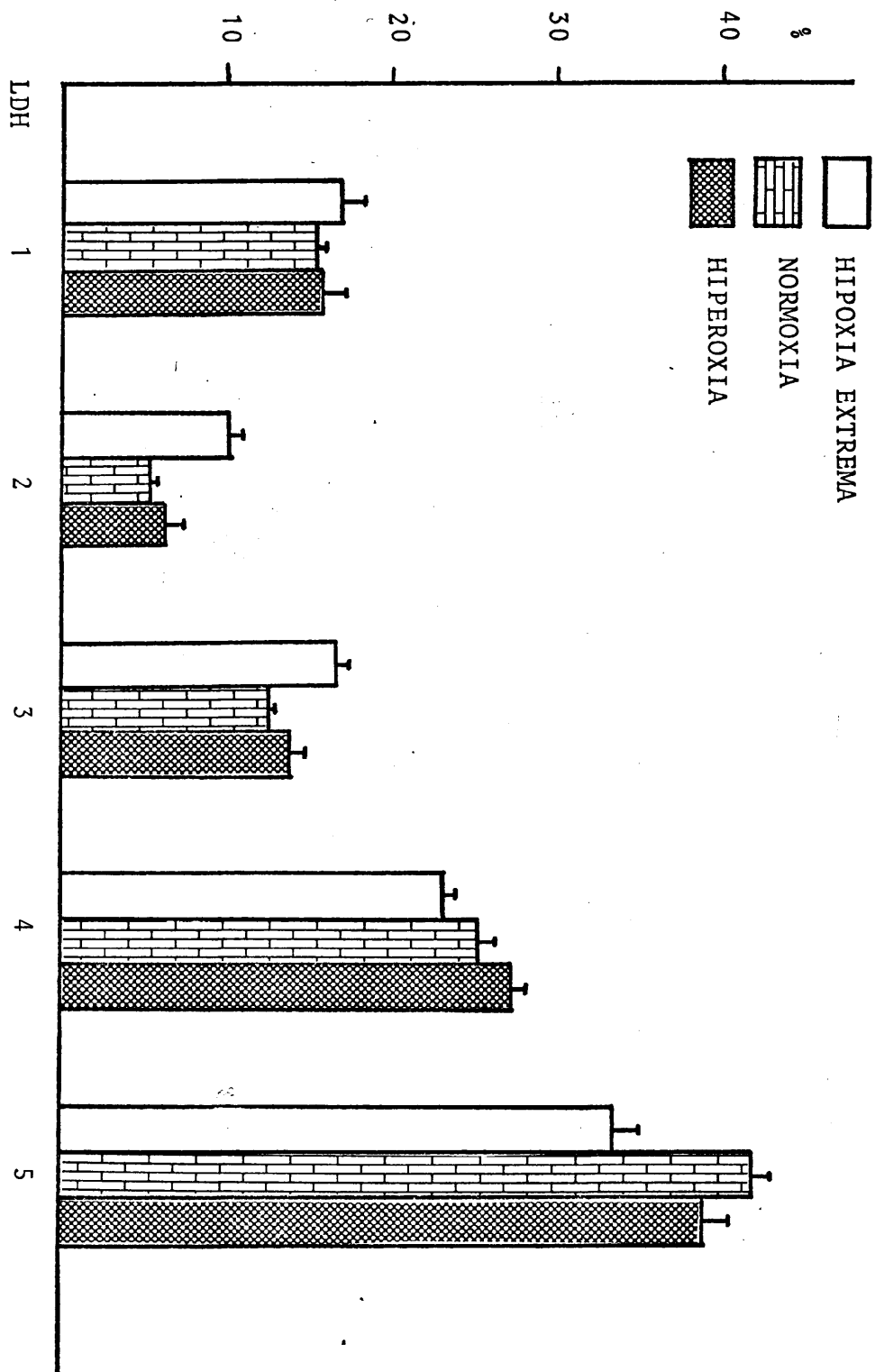


FIG. 15.- REPRESENTACION GRAFICA DE LAS ACTIVIDADES RELATIVAS LDH EN LA COLA DE LARVAS ADAPTADAS DURANTE 15 DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA EXTREMA, NORMOXIA E HIPEROXIA. ESTÁ DO XIV.

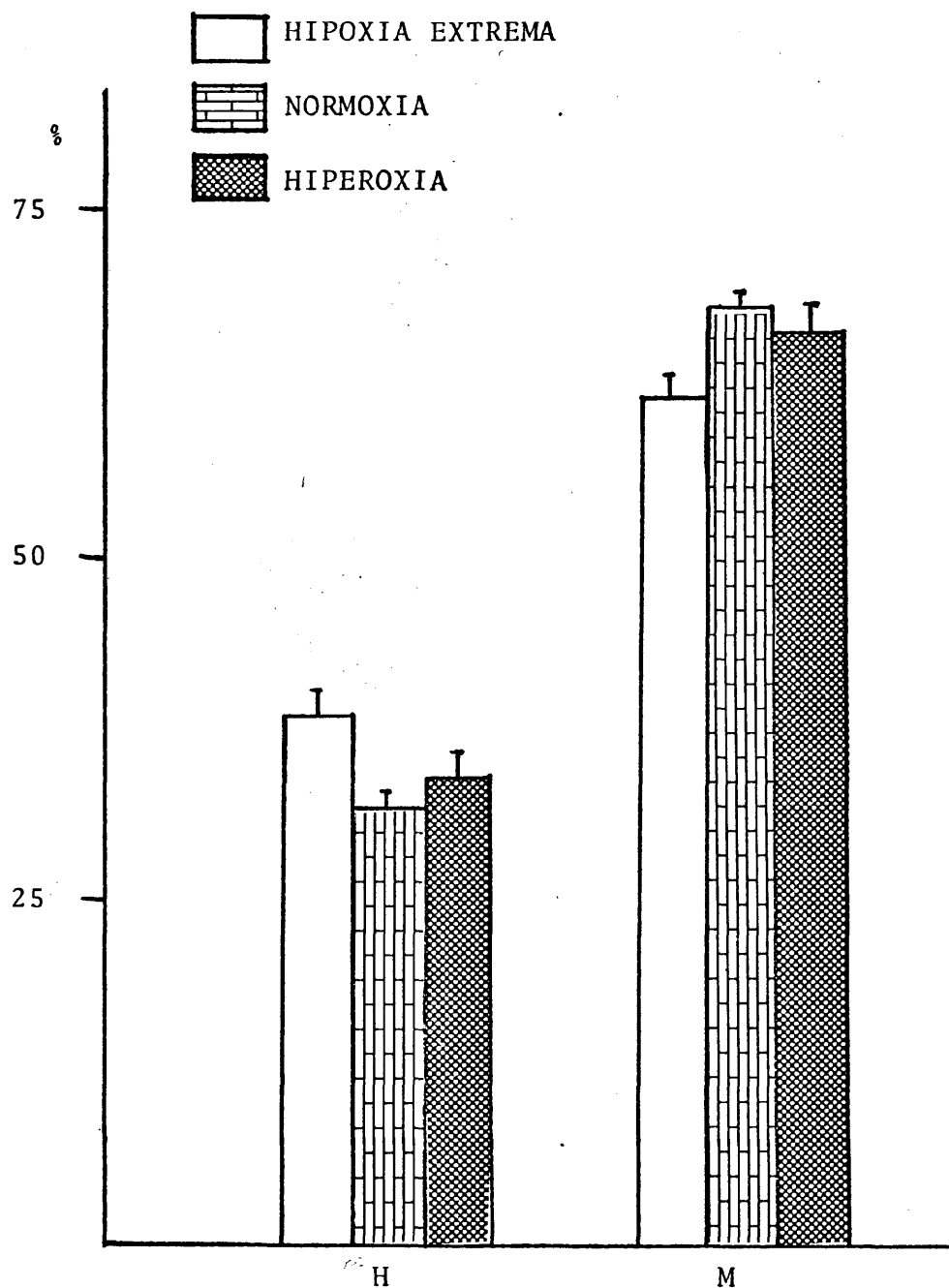


FIG. 16.- REPRESENTACION GRAFICA DEL % DE SUBUNIDADES H Y M EN LA COLA DE LARVAS ADAPTADAS DURANTE 15 DIAS A CONDICIONES DE HIPOXIA EXTREMA, NORMOXIA E HIPEROXIA. ESTADO XIV.

la relación M/H ($0,005 < p < 0,01$) de 2,1 a 1,6.

La comparación de los grupos de normoxia e hiperoxia no mostró diferencias significativas en ninguna de las isoenzimas ni en las subunidades.

Al relacionar los dos grupos restantes, el de hipoxia extrema con respecto al de hiperoxia, se pudo observar de nuevo: a) un aumento significativo de las isoenzimas LDH 2 ($p < 0,005$) de 6,2 a 10,0%; y LDH 3 ($0,025 < p < 0,05$) de 13,6 a 16,5%; b) una disminución estadísticamente significativa de las isoenzimas LDH 4 ($0,025 < p < 0,05$) de 26,0 a 23,3%; y LDH 5 ($0,025 < p < 0,05$) de 38,5 a 33,2%; de las subunidades de tipo M ($0,025 < p < 0,05$) de 66,1 a 61,5%; y de la relación M/H ($0,025 < p < 0,05$) de 2,0 a 1,6.

Como resumen de estos resultados se pudo deducir que: a) la isoenzima LDH 2 presentó siempre el coeficiente de variación más alto (20-37%) y el valor más bajo, b) el músculo caudal presenta un patrón de isoenzimas LDH que tiende a ser intermedio (68,1% M y 31,9% de H en normoxia); c) la aclimatación a hipoxia extrema provoca un aumento de las isoenzimas LDH 2 y LDH 3 y un descenso de las isoenzimas LDH 4 y LDH 5 (20% de descenso respecto a normoxia) así como también un descenso de las subunidades de tipo M y de la rela---

ción M/H (23% de descenso respecto a normoxia). Como resultado, el patrón de isoenzimas es más intermedio en hipoxia extrema que en los otros dos grupos.

3.- Actividad de la LDH durante el desarrollo embrionario.

Se utilizó una puesta de Discoglossus pictus para el estudio de las actividades total y específica de la LDH durante los desarrollos embrionario y larvario. En esta sección se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo embrionario definido desde la fecundación hasta el comienzo de la alimentación. Se incluyen también datos obtenidos justo antes de la fecundación. Se utilizaron un total de 175 embriones y las condiciones de medida fueron saturantes para el sustrato (piruvato) y el cofactor (NADH), el pH de 7,0 (óptimo) y la temperatura 20°C. Se analizaron los siguientes estados: 0 (oocito maduro no fecundado), 6 (mórula), 10 (gástrula, botón vitelino), 14 (neurula), 23 (circulación branquial) y 27 (inicio de movimiento espontáneo). Los resultados se expresan en la tabla XXIV en n moles de NADH oxidados/minuto/embrión (actividad total LDH) y en n moles de NADH oxidados/minuto/mg de proteína (actividad específica LDH).

Los datos referentes a la actividad total (Tabla XXIV y fig. 17) mostraron diferencias significativas al someterlos conjuntamente a un análisis de varianza. Comparando

T A B L A XXIV

ACTIVIDAD TOTAL Y ESPECIFICA DE LA LDH DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.

ESTADO	ACTIVIDAD TOTAL ¹	ACTIVIDAD ESPECIFICA ²
0 _(4,5)	131 ± 10 ****	1045 ± 168
6 _(5,5)	189 ± 20 *	1227 ± 166 **
10 _(8,5)	224 ± 38 **	1509 ± 201 *
14 _(4,5)	166 ± 25	1270 ± 230 ***
23 _(5,5)	152 ± 24	870 ± 112
27 _(9,5)	152 ± 16	823 ± 76

1) n moles NADH/min./embrión; 2) n moles NADH/min./mg.prot.

Los resultados se expresan como la media ± desviación típica.

(a,b): a= número de extractos; b= número de embriones por extracto.

Los análisis de varianza muestran diferencias significativas. Prue-

ba de Scheffé: * diferencia significativa ($p < 0,05$); ** diferencia

significativa ($p < 0,025$); *** diferencia significativa ($p < 0,01$);

**** diferencia significativa ($p < 0,005$). Los asteriscos muestran

diferencias significativas entre los datos entre los cuales están

situados verticalmente en la tabla.

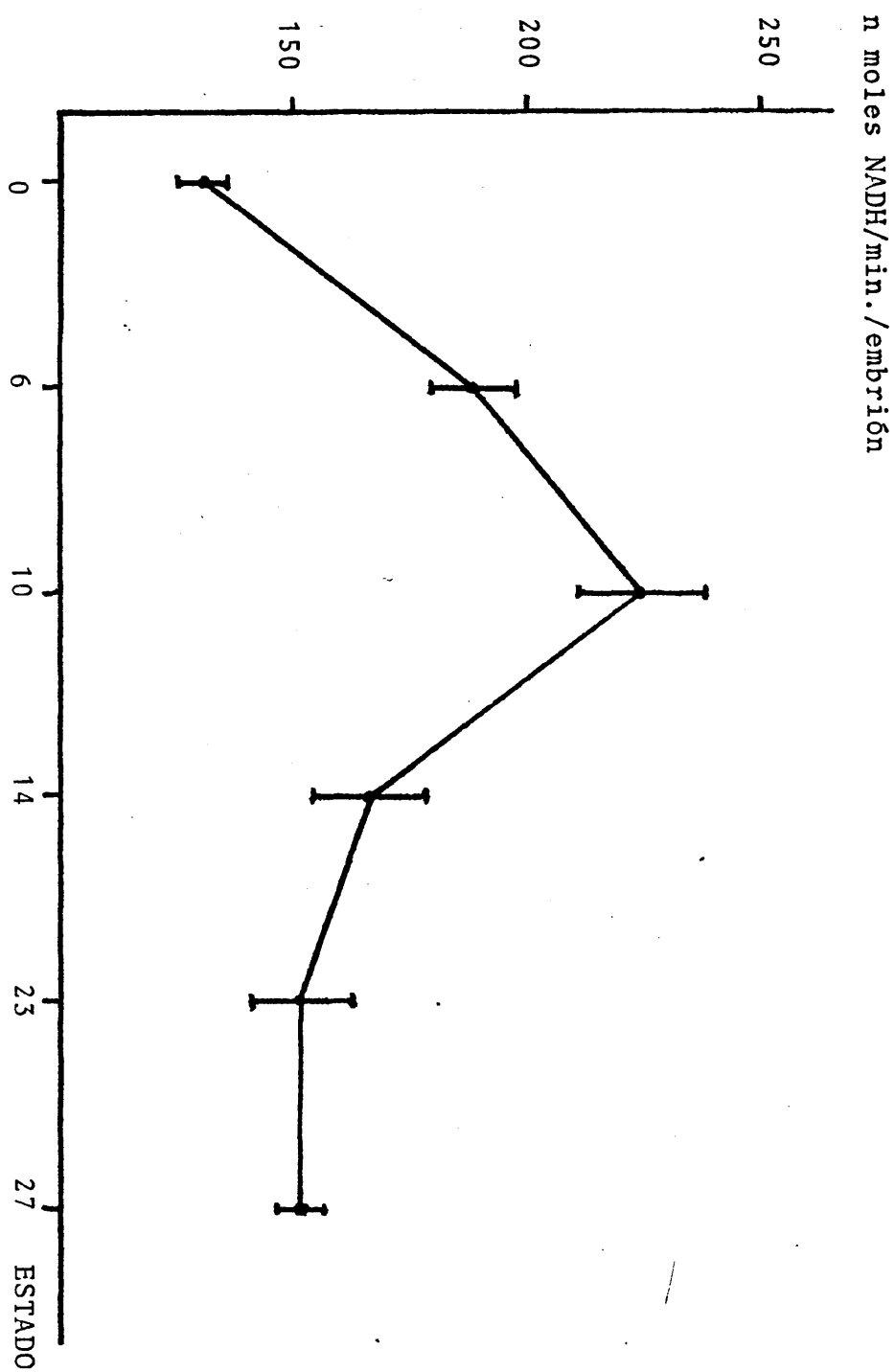


FIG. 17.- ACTIVIDAD TOTAL LDH. DESARROLLO EMBRIONARIO. Los valores son medias \pm error de la media.

las medias dos a dos en sucesión temporal, se pudo observar: un aumento muy significativo ($p < 0.005$) desde el estado 0 (131 ± 10) al estado 6 (189 ± 20); un nuevo aumento significativo ($0,025 < p < 0,05$) desde el estado 6 (189 ± 20) al estado 10 (224 ± 38); un descenso significativo ($0,01 < p < 0,025$) desde el estado 10 (224 ± 38) al estado 14 (166 ± 25). En el resto de los estados no se observaron diferencias significativas. Resumiendo estos resultados, hubo un ascenso continuo de la actividad total LDH desde el estado 0 hasta llegar a un máximo en el estado 10 para descender luego a un valor algo menor al observado en el estado 6 y mantenerse a este nivel durante el resto del desarrollo embrionario analizado. El resultado es un pico de actividad en el estado 10 (gástrula) como se ve en la figura 17.

En la tabla XXIV y la figura 18 se muestran los resultados correspondientes a la actividad específica de la LDH. Los datos referentes a todos los estados tomados conjuntamente mostraron diferencias significativas. Entre los estados 0 y 6 hubo un aumento que no resultó significativo. La actividad específica aumentó significativamente ($0,01 < p < 0,025$) desde el estado 6 (1227 ± 166) al estado 10 (1509 ± 201), experimentó un descenso significativo ($0,025 < p < 0,05$) entre los estados 10 (1509 ± 201) y 14 (1217 ± 230) y de nuevo una disminución significativa ($0,005 < p < 0,01$) desde el estado 14 (1270 ± 230) hasta el estado 23 (870 ± 112). Entre los estados 23 y 27 no hubo diferencias significativas. En la figura 18 se repre-

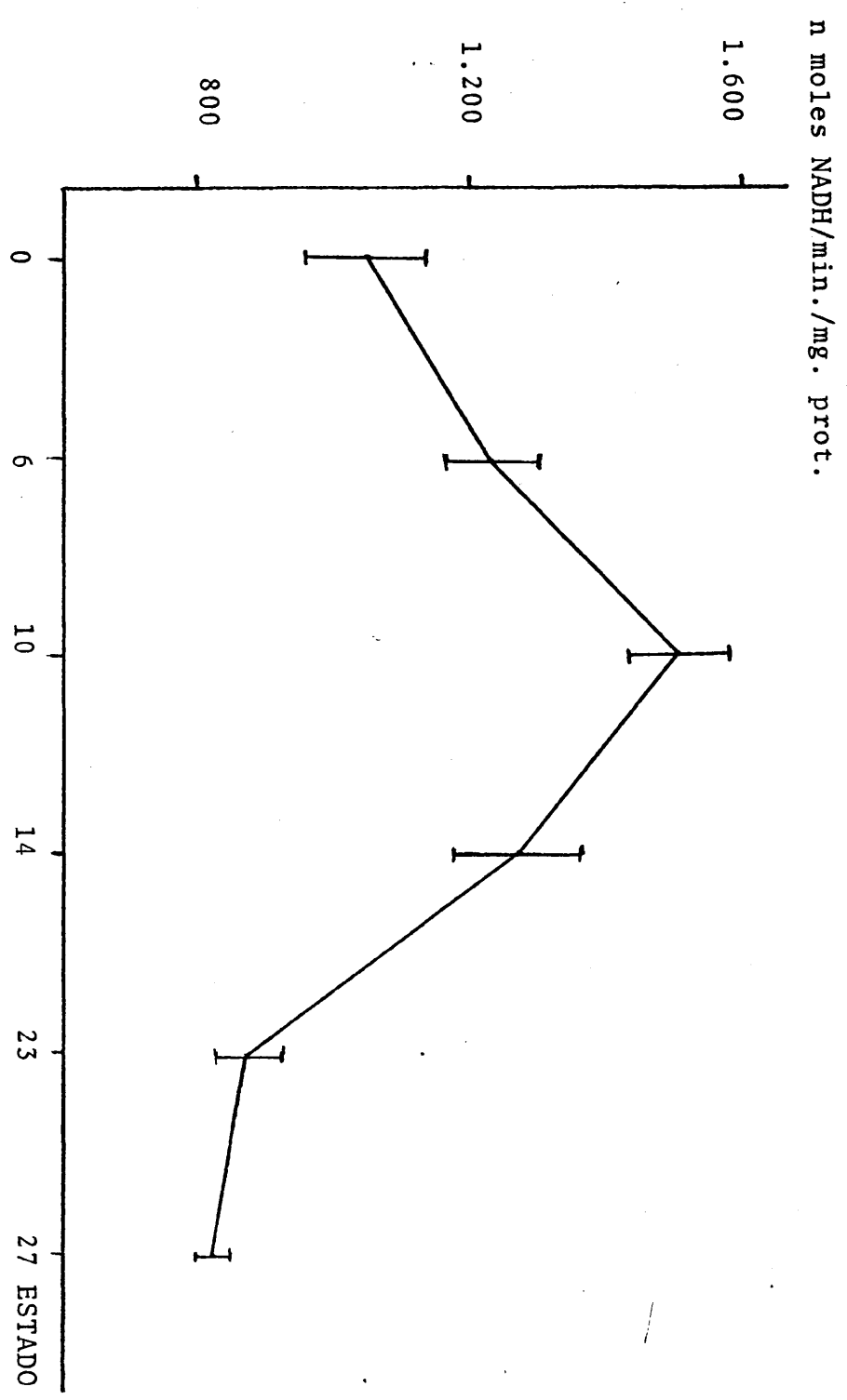


Fig. 18.- ACTIVIDAD ESPECIFICA LDH. DESARROLLO EMBRIONARIO.
Los valores son medias \pm error de 1a media.

sentan las medias con sus errores, observándose un aumento de actividad específica LDH desde el estado 0 al estado 10 para disminuir luego hasta el estado 23 y mantenerse estable en un valor bajo hasta el estado 27. Como resultado se produjo, al igual que en el caso de la actividad total LDH, un pico de actividad que tiene su máximo en la gástrula (estado 10).

4.- Actividad de la LDH durante el desarrollo larvario.

Se utilizaron 39 larvas procedentes de la misma puesta que la usada para la determinación durante el desarrollo embrionario. Las condiciones de medida fueron también saturantes para sustrato (piruvato) y cofactor (NADH) así como pH 7.0 y 20°C. El período larvario se define desde el inicio de la alimentación hasta el final de la meta--morfosis. Se analizaron los siguientes estados: I (ini--cio de la alimentación), XII (esbozos de los 5 dedos), XVII (final de la prometamorfosis), XX (extremidades anteriores libres), XXIII (cola reducida a 1/5 de su longitud), XXV (fin de la metamorfosis). En la tabla XXV aparecen los resultados correspondientes a las actividades total y específica de la LDH.

La actividad total se expresa (tabla XXV y fig. 19) en μ moles de NADH oxidados por minuto y por larva. Esta ac

T A B L A XXV

ACTIVIDAD TOTAL Y ESPECIFICA DE LA LDH DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO.

ESTADO	ACTIVIDAD TOTAL ¹	ACTIVIDAD ESPECIFICA ²
I ₍₈₎	0,74 \pm 0,09 ****	0,89 \pm 0,07
XII ₍₆₎	3,55 \pm 0,46 ****	0,90 \pm 0,10 ****
XVII ₍₇₎	22,56 \pm 2,00	3,01 \pm 0,34 **
XX ₍₉₎	22,39 \pm 4,82	3,48 \pm 0,50
XXIII ₍₅₎	18,88 \pm 4,91 ****	3,44 \pm 0,56 **
XXV ₍₄₎	8,72 \pm 2,11	2,40 \pm 0,52

1) μ moles NADH/min./larva; 2) μ moles NADH/min./mg.prot.

Los resultados se expresan como la media \pm desviación típica.

() = número de extractos. Los análisis de varianza muestran diferencias significativas. Prueba de Scheffé: ** diferencia significativa ($p < 0,025$); **** diferencia significativa ($p < 0,005$).

Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los datos entre los cuales están situados verticalmente en la tabla.

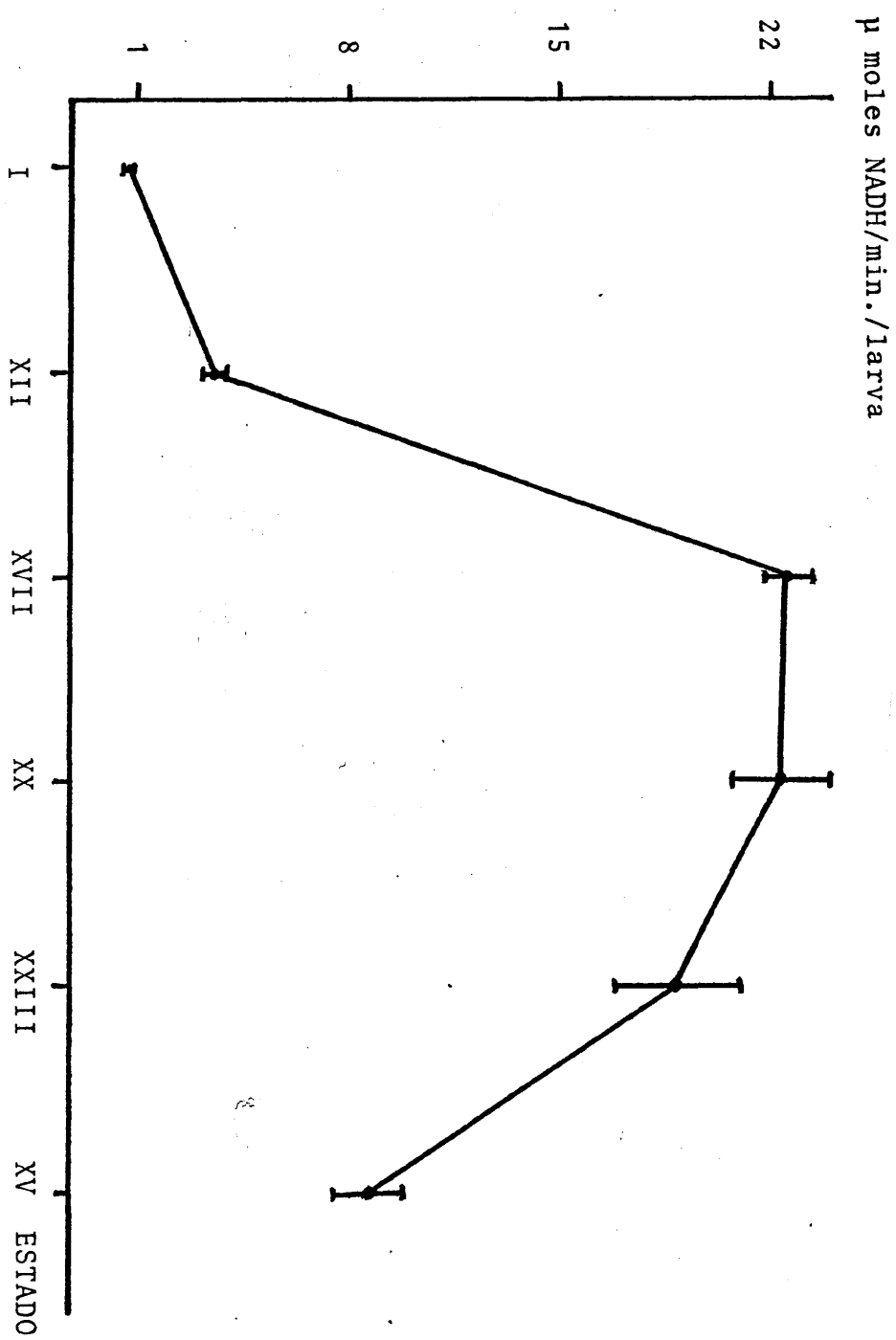


FIG. 19.- ACTIVIDAD TOTAL LDH. DESARROLLO LARVARIO. Los valores son medias
+ error de la media.

tividad experimentó: un aumento muy significativo ($p < 0,005$) entre los estados I ($0,74 \pm 0,09$) y XII ($3,55 \pm 0,46$); un nuevo aumento muy significativo ($p < 0,005$) entre los estados XII ($3,55 \pm 0,46$) y XVII ($22,56 \pm 2,00$), y un descenso también muy significativo ($p < 0,005$) entre los estados XXIII ($18,88 \pm 4,91$) y XXV ($8,72 \pm 2,11$). La representación gráfica de estos resultados (fig. 19) muestra un aumento de la actividad total desde el estado I al estado XII que se hace más intenso entre los estados XII y XVII. Posteriormente, se mantiene estable en un valor alto entre los estados XVII y XXIII para descender luego en el estado XXV.

Los datos correspondientes a la actividad específica (Tabla XXV y fig. 20) mostraron: un aumento muy significativo ($p < 0,005$) entre los estados XII y XVII de $0,90 \pm 0,10$ a $3,01 \pm 0,34$, un aumento significativo ($0,01 < p < 0,025$) desde el estado XVII ($3,01 \pm 0,34$) al estado XX ($3,48 \pm 0,50$) y un descenso significativo desde el estado XXIII ($3,44 \pm 0,56$) al estado XXV ($2,40 \pm 0,52$). El aspecto de la gráfica que relaciona la actividad específica LDH con el desarrollo larvario a lo largo del tiempo (fig. 20) es similar al obtenido para la actividad total mostrando un máximo de actividad durante el clímax metamórfico. La diferencia más notable entre ambas gráficas (fig. 19 y 20) es que mientras que la actividad total por larva aumenta desde el

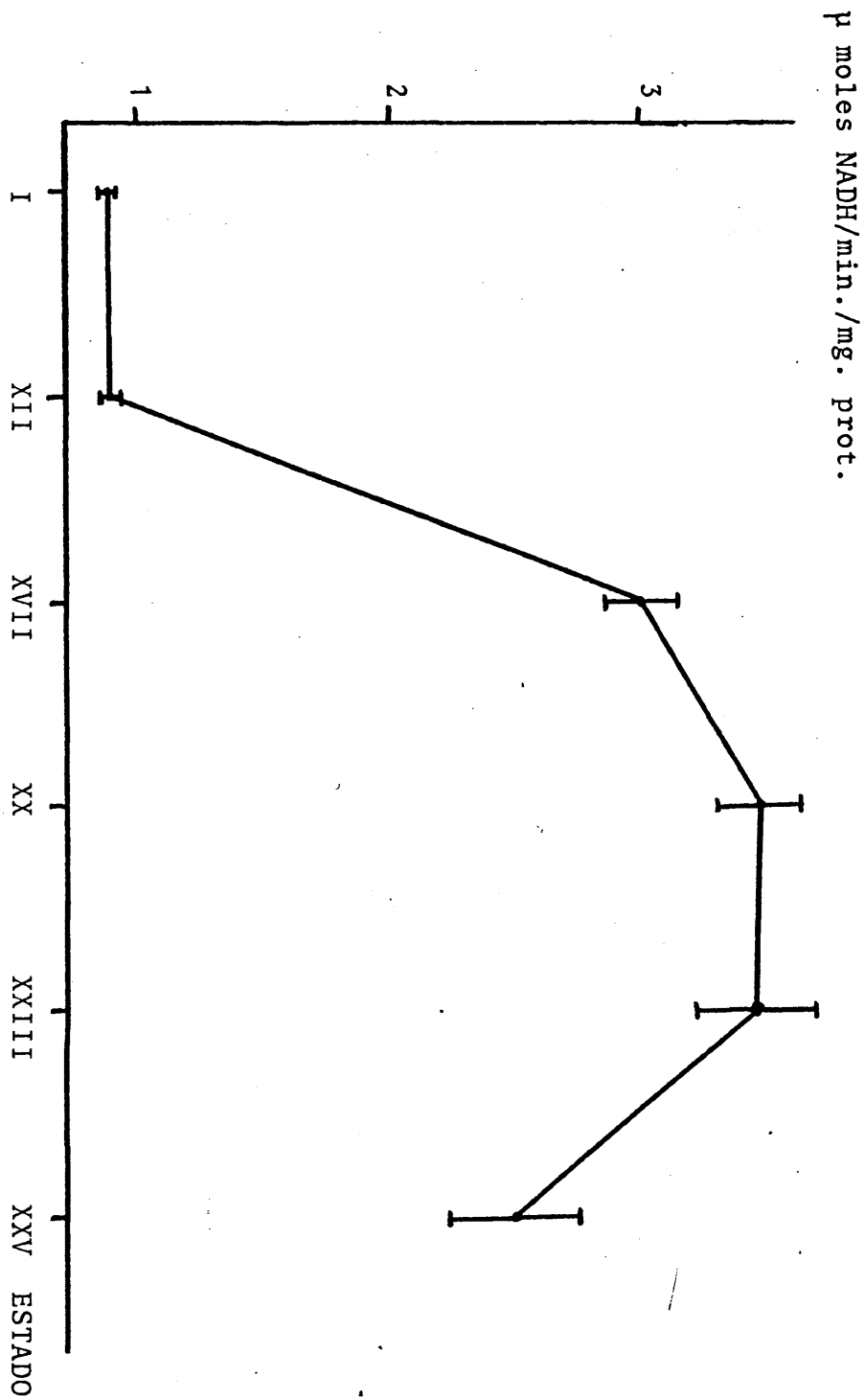


FIG. 20.- ACTIVIDAD ESPECIFICA LDH. DESARROLLO LARVARIO. Los valores son medias \pm error de la media.

estado I al XII, la actividad específica por mg. de proteína se mantiene estable entre dichos estados.

VI EFECTO DEL ACIDO OXAMICO SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.

Se realizaron cinco experimentos sobre la acción del oxamato de sodio sobre el desarrollo.

Experimento 1

Se realizó en los estados 6 (gástrula), 14 (neurula) y 19 (respuesta a la estimulación mecánica). En cada estado se hicieron cuatro grupos de seis embriones cada uno. Cada grupo de embriones se colocó en una placa petri. Las placas petri contenían: agua desclorada (grupo 1), disolución de ClNa 0,1M (grupo 2), oxamato sódico 0,01M (grupo 3) y oxamato sódico 0,1M (grupo 4). Las disoluciones de los grupos 2,3 y 4 se hicieron utilizando agua desclorada.

Los resultados obtenidos fueron los mismos en los tres estados estudiados. Al cabo de doce horas de permanencia en los citados medios los dos grupos controles (agua desclorada y ClNa 0,1M) continuaban su desarrollo embrionario que siguió con normalidad hasta la metamorfosis. Los grupos que habían permanecido en oxamato sódico 0,01 y 0,1M detuvieron su desarrollo en el estado de inicio del experimento y murieron habiéndose producido disgregación celular más o menos acusa-

da al cabo de doce horas.

Experimento 2

Se utilizaron 50 embriones en estado 19 (respuesta a la estimulación mecánica) para realizar experimentos sobre el efecto de la concentración de oxamato sódico en el desarrollo. Se hicieron 10 grupos con cinco embriones por grupo, en estado 19. El grupo 1 se mantuvo en agua desclorada, el grupo 2 en ClNa 0,1 M y los otros ocho grupos se mantuvieron en las siguientes concentraciones de oxamato sódico: grupo 3 (10^{-5} M de oxamato), grupo 4 (10^{-4} M), grupo 5 (5×10^{-4} M), grupo 6 (10^{-3} M), grupo 7 (5×10^{-3} M), grupo 8 (10^{-2} M) grupo 9 (5×10^{-2} M) y grupo 10 (10^{-1} M). Al cabo de doce horas los grupos 6,7,8,9 y 10 habían detenido su desarrollo en el estado inicial (estado 19) y comenzaban a sufrir disgregación celular. A las doce horas, los grupos 1,2,3,4 y 5 habían avanzado su desarrollo hasta el estado 20 (primer par de branquias). Estos cinco últimos grupos siguieron su desarrollo sin cronizadamente, alcanzando el estado 25 (circulación caudal) a las sesenta horas y el estado 29 (opérculo branquial) a las ciento ocho horas. En estos grupos se renovó el medio dos veces por día. Todas las disoluciones se hicieron en agua desclorada. Los resultados suponen que las concentraciones iguales o superiores a 10^{-3} M de oxamato producen la muerte del embrión antes de doce horas, mientras que las concentraciones iguales o inferiores a 5×10^{-4} M de oxamato no afectan vi-

siblemente el desarrollo ni su velocidad respecto a los controles (grupos 1 y 2) al menos en las primeras ciento ocho horas.

Experimento 3

Se realizó un tercer experimento para medir el tiempo en que se produce la muerte de los embriones debida al oxamato. Se hicieron tres grupos de 10 larvas cada uno en estado 19: el grupo 1 se mantuvo en agua desclorada, el grupo 2 en $\text{ClNa } 10^{-3}\text{M}$ en agua desclorada y el grupo 3 en oxamato sódico 10^{-3}M disuelto también en agua desclorada. Se definió como supervivientes a los embriones que seguían desarrollando una respuesta muscular ante un estímulo mecánico aplicado con una aguja imangada por el observador. La figura 21 muestra el descenso del número de supervivientes con respecto al tiempo. Se hicieron pruebas cada quince minutos. En el grupo 3 (oxamato 10^{-3}M), el primer embrión que dejó de mostrar respuesta lo hizo a los 60 minutos de iniciarse el experimento. A los 195 minutos ninguno de los embriones mostró ya respuesta muscular. El tiempo medio que tardaron el 50% de los em--briones en no mostrar ^{no} respuesta fue de 120 a 135 minutos. En los grupos 1 y 2 el 100% de los embriones mostró respuesta durante todo el período del experimento.

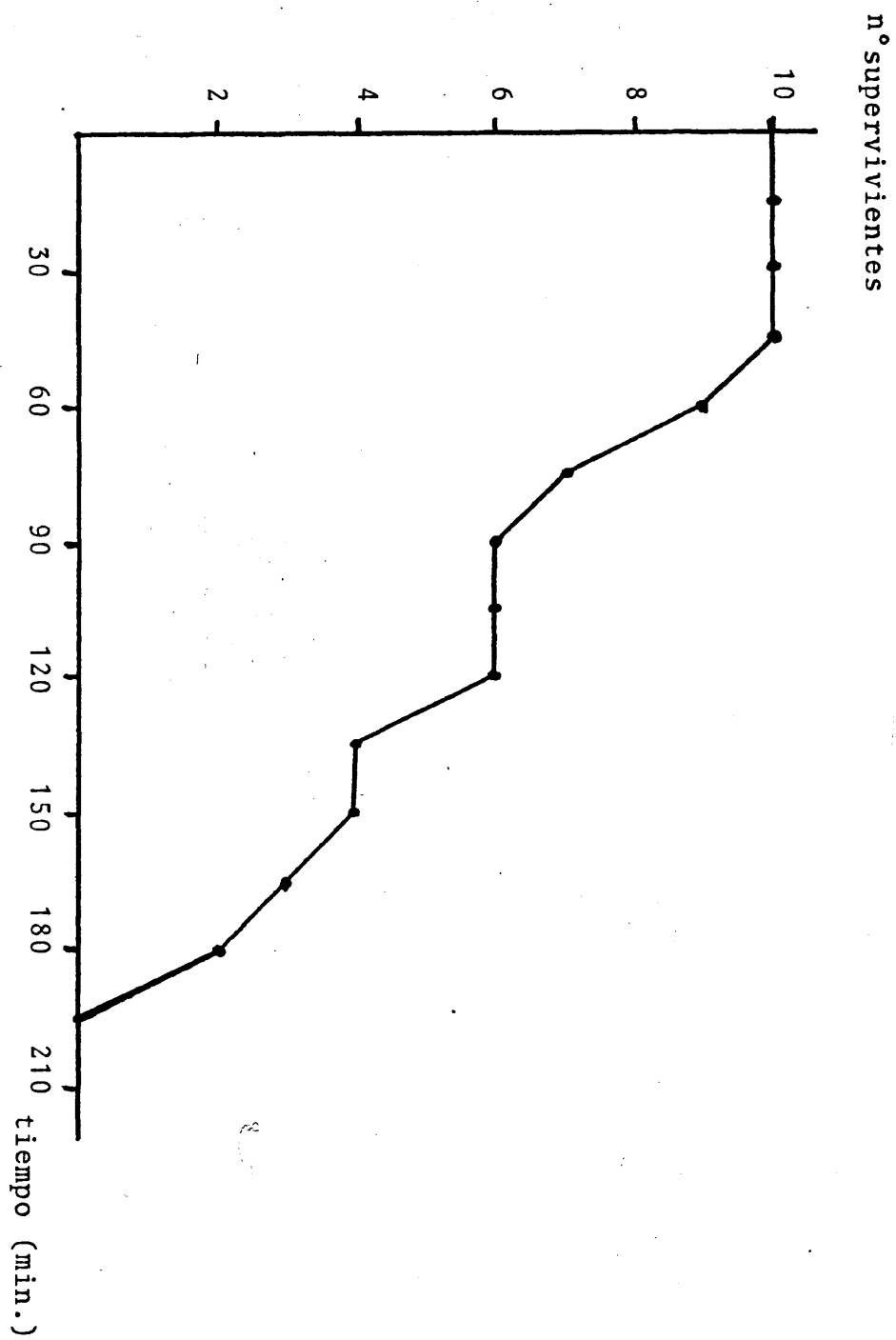


FIG. 21.- TIEMPO DE ACCION DEL ACIDO OXAMICO 10^{-3} M SOBRE LA MORTALIDAD. ESTADO 19.

Experimento 4

Se repitió el experimento 3 con una variante. Se realizó también con tres grupos de 10 larvas en estado 19: grupo 1 (agua desclorada), grupo 2 ($\text{ClNa } 10^{-3}\text{M}$ en agua desclorada) y grupo 3 (oxamato sódico 10^{-3}M en agua desclorada). los grupos 1 y 2 mostraron respuesta muscular durante todo el experimento. En el grupo 3, al cabo de 150 minutos, el 50% de los embriones (cinco embriones) había dejado de mostrar respuesta muscular. En ese momento (150 minutos desde el comienzo de la experiencia), el grupo 3 se dividió en dos subgrupos: los cinco embriones que aún mostraban respuesta se pasaron a agua desclorada (grupo 3a) y los otros cinco embriones que ya no mostraban respuesta (grupo 3b) se pasaron también a otra placa de Petri con agua desclorada. El paso a las placas de Petri con agua desclorada fue seguido de 5 lavados (1 cada dos minutos) con ese mismo tipo de agua. Los embriones del grupo 3a siguieron mostrando respuesta muscular y continuaron su desarrollo al mismo ritmo que los de los grupos 1 y 2. Los del grupo 3b sin embargo, no recuperaron la respuesta muscular y sufrieron disgregación celular posteriormente.

Experimento 5

En este quinto y último experimento se dispusieron 50 embriones en cinco grupos con 10 embriones cada uno: grupo 1 (agua

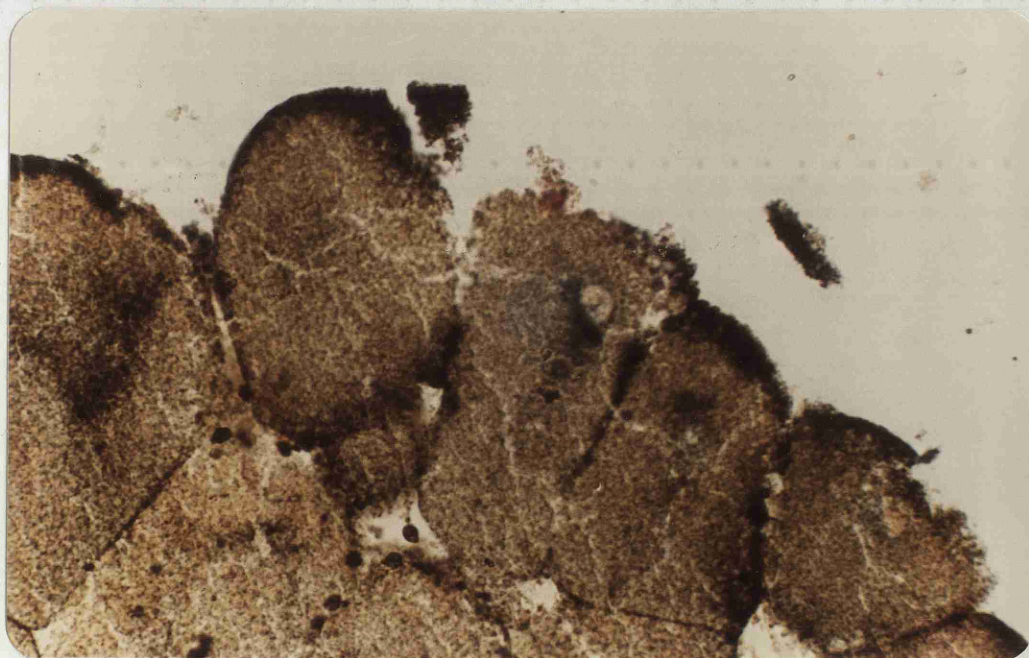
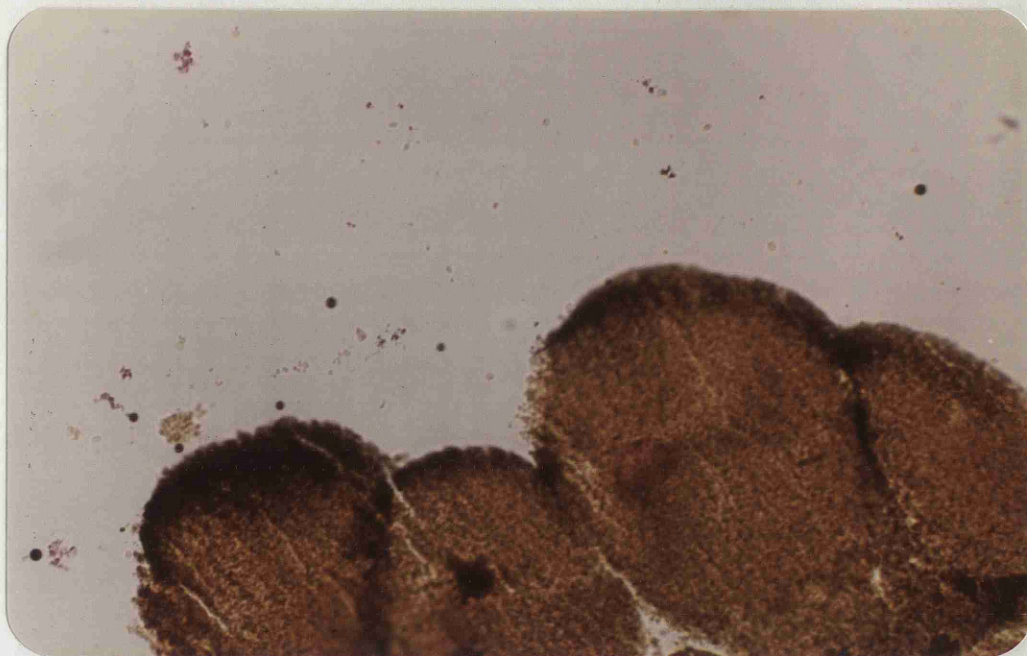
descolorada), grupo 2 ($\text{Cl Na } 2 \times 10^{-3} \text{M}$), grupo 3 (oxamato sódico 10^{-3}M), grupo 4 (oxamato sódico 10^{-3}M + piruvato 10^{-4}M), grupo 5 (oxamato sódico 10^{-3}M + piruvato 10^{-3}M). Al cabo de doce horas los dos primeros grupos seguían mostrando respuesta muscular, mientras que esta respuesta había desaparecido en los grupos 3 y 4 que mostraban ya disgregación celular. El grupo 5, sin embargo, seguía mostrando respuesta muscular al cabo de las doce horas y siguió su desarrollo con normalidad junto con los grupos 1 y 2 durante todo el desarrollo embrionario y larvario.

VII LOCALIZACION HISTOQUIMICA DE LA LDH EN EL DESARROLLO EMBRIO NARIO.

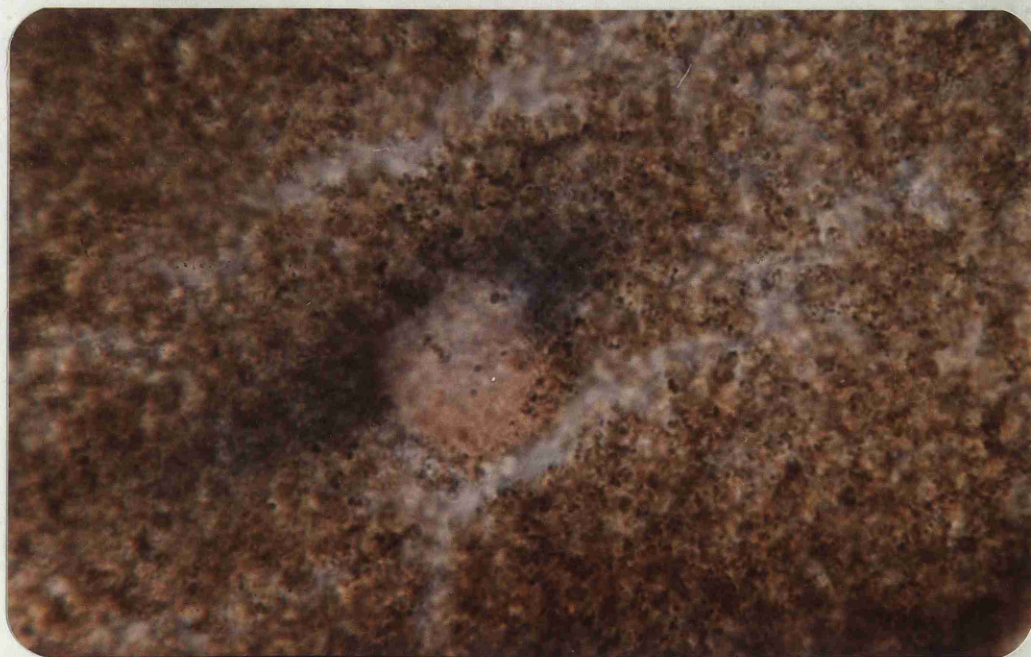
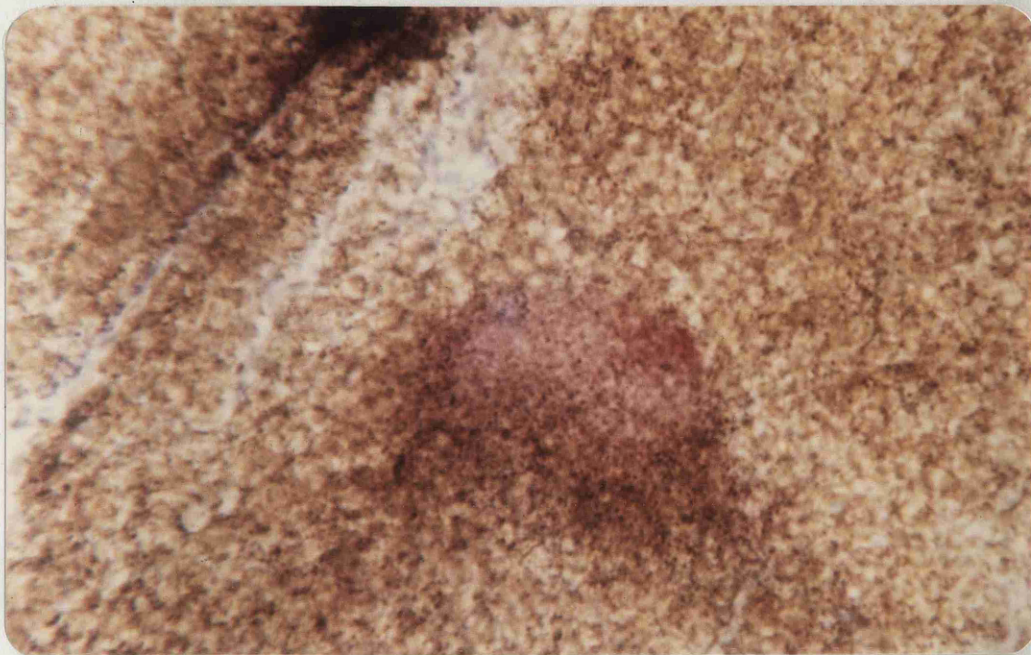
El estudio de la localización histoquímica de la LDH se realizó como se describe en la sección métodos II-5. Tal y como se realiza la reacción, la LDH se identifica por el color azul-violáceo que corresponde al precipitado insoluble del formazán. Se estudiaron los estados de mórula y gástrula. En el estado 6 (morula), se incubaron 5 embriones en revelador sin lactato (controles) y 10 embriones en revelador con lactato. En la fotografía 11 aparece a la derecha una morula control y a la izquierda una mórula experimental. Las mórulas control, después de ser incubadas en ausencia de substrato no experimentan ninguna variación respecto a las tratadas con fijador. Las mórulas incubadas con lactato presentan un tono azul violáceo (indicador de la LDH) con respecto a las controles. Este tono azulado se hace más patente en las células del polo vegetativo, ya que en el polo animal la cantidad mucho mayor de pigmento enmascara la reacción. Para evitar este enmascaramiento, se estudiaron al microscopio óptico, cortes seriados de los embriones incubados. Aparece una tenue reacción distribuída por toda la superficie celular en las mórulas incubadas en presencia de lactato. Sin embargo, además de esta ligera distribución uniforme, la LDH se localiza de una forma extremadamente intensa y sistemática alrededor de los núcleos celulares (fotos 12 y 14). Las mórulas



Fotografía 11.- Mórulas experimental (izda) y control (dcha). Localización LDH. M.O. x 45.



Fotografías 12 (↑) y 13 (↓).- Cortes al M.O. x 200.
Localización de la LDH. Mórula. 12 = control; 13 = ex-
perimental.



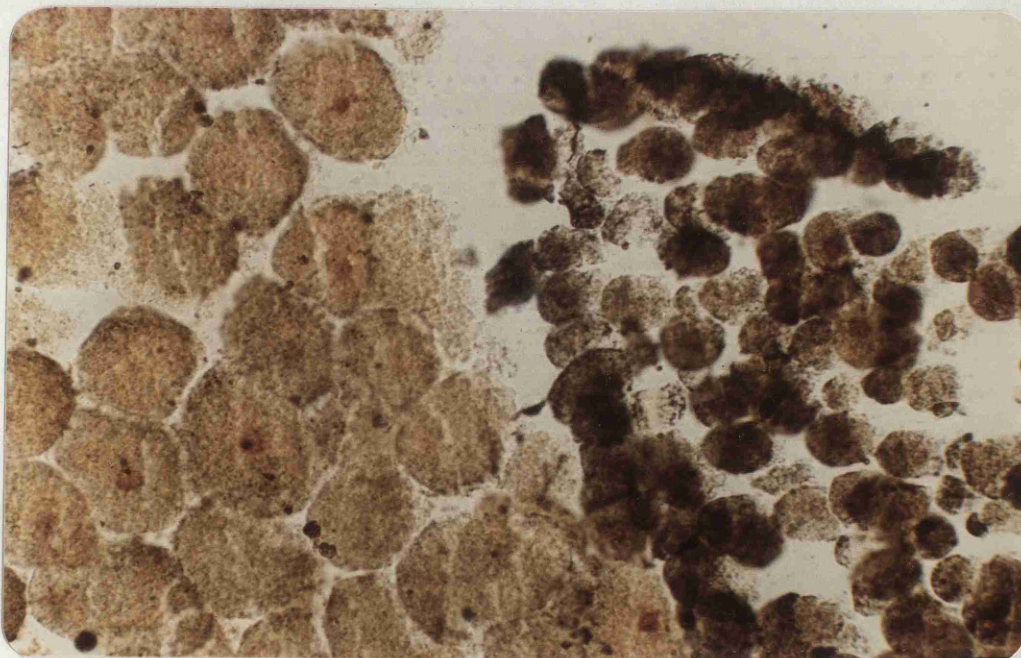
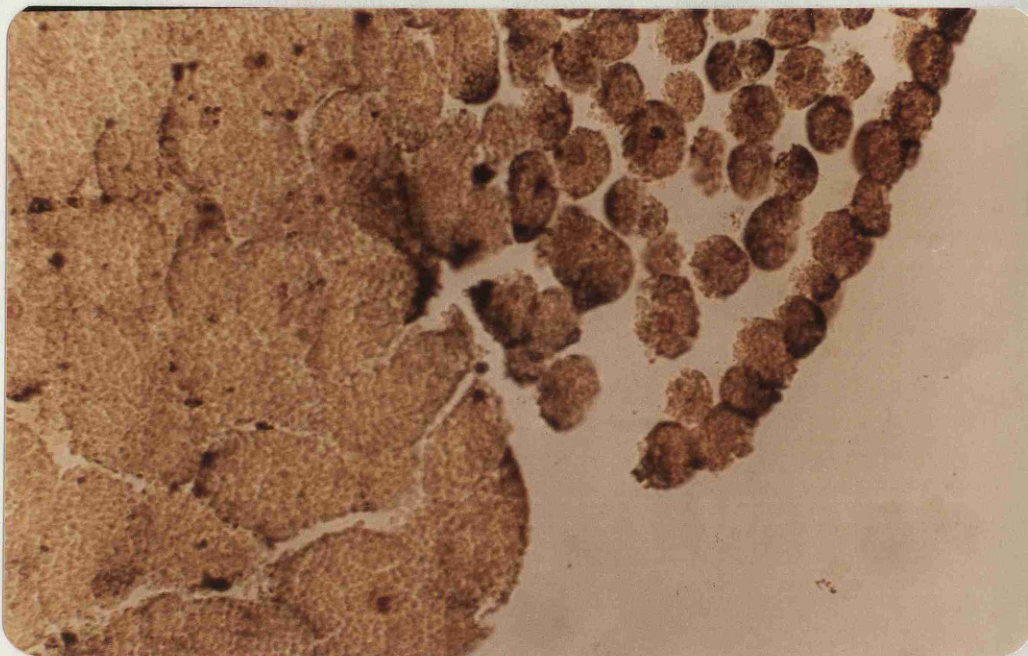
Fotografías 14 (↑) y 15 (↓). M.O. x 1.000. Localización de la LDH. Mórula. 14 = control; 15 = experimental.

control no mostraron, sin embargo, ninguna actividad LDH (fotogr. 13 y 15). Esta LDH que aparece alrededor del núcleo se presenta en todas las células, tanto en las del polo animal como en las del polo vegetativo.

Para el estado de gástrula se utilizaron 10 embriones control que se incubaron en ausencia de lactato y 20 embriones incubados en revelador con lactato. Los embriones incubados en presencia de lactato presentaron un oscurecimiento externo general debido a la precipitación del formazán. El precipitado se hace patente en la zona del botón vitelino, por ser este menos pigmentado (fotogr. 16), pero aparece siempre con especial intensidad en la zona del labio dorsal del blastoporo. El estudio al microscopio óptico confirma esta observación, ya que la LDH se localiza preferentemente en el ectoblasto y con especial intensidad en el labio dorsal del blastoporo (fotogr. 17). Aparece también, aunque con intensidad mucho menor, en el labio ventral del blastoporo y muy débilmente en la zona del botón vitelino. La LDH aparece también en este estado distribuida tenue y uniformemente por todo el citoplasma. Las gástrulas control (fotogr. 18) no mostraron actividad LDH.



Fotografía 16.- Gastrulación. M.O.x40. Localización de la LDH.



Fotografías 17 (↑) y 18 (↓). M.O. x 200. Gastrulación. Localización de la LDH. 17 = control; 18 = experimental.

D-I-S-C-U-S-I-O-N

La existencia de polimorfismos bioquímicos en las isoenzimas LDH de los anfibios ha sido referida en varias especies. En general, se ha observado una variabilidad mucho mayor en las subunidades H que en las M, sugiriéndose que el locus Ld-H sería más sensible a las variaciones ambientales y estaría sufriendo una selección más acusada relacionada con una mayor diversidad (Salthe y Nevo, 1969). La variación se corresponde también con los grupos filogenéticos, de forma que los ránidos presentan variaciones en las subunidades H pero no en las subunidades M de la enzima. En los anuros sólo se han referido hasta la actualidad cuatro casos de variaciones en las subunidades M, en los géneros Hyla, Bombina (Szymura y Swies, 1979) y Xenopus (Lyra et al., 1976)

En muchos casos se han propuesto variaciones en las subunidades para explicar los polimorfismos, pero esto se ha hecho sólo a partir de las movilidades electroforéticas observadas, por lo que las interpretaciones no pasan de ser hipótesis. De hecho, algunos autores han propuesto explicaciones a algunos polimorfismos, basadas en modificaciones epigenéticas (Yamamura et al., 1979). Sólo en algunos casos se han realizado cruzamientos entre los distintos fenotipos. En estos casos, como ocurre en Bombina y Rana (Wright y Moyer, 1968), sí se ha podido comprobar que el polimorfismo estaba originado por variantes alélicas, normalmente con herencia intermedia, que segregan en un mismo locus. Esto muestra la importancia de realizar estudios genéticos para aclarar el origen de los polimorfismos. Normalmente se acepta como explicación

más lógica y sencilla que los alelos responsables son los que codifican para las subunidades que muestran la variación. Hace tiempo se propuso sin embargo, una explicación alternativa, suponiendo que varios sistemas isoenzimáticos estarían unidos a proteínas transportadoras y así la variabilidad polimórfica podría deberse a diversos alelos que codifican para el transportador (Agrell y Kjellberg, 1965). Esta suposición estaba basada, sin embargo, en resultados parciales y no ha recibido confirmaciones posteriores.

Los patrones electroforéticos obtenidos por nosotros para las isoenzimas LDH de Discoglossus pictus han mostrado la presencia de tres fenotipos LDH que difieren en la movilidad de sus isoenzimas hacia el ánodo, por lo que son denominables como LDH-rápido, LDH-intermedio y LDH-lento. El patrón LDH es una característica de cada individuo que se mantiene constante en todos los órganos y tejidos tanto de la larva como del adulto. El estudio cuantitativo de la movilidad relativa de las cinco isoenzimas, nos ha permitido comprobar la existencia de una correlación directa y significativa entre el número de subunidades M de que está compuesto cada tetramero y su movilidad. Así, la movilidad de todas las isoenzimas, excepto la LDH-1, difiere significativamente entre los tres tipos y esta diferencia de movilidad aumenta desde la LDH-2 a la LDH-5. Como resultado, las isoenzimas del fenotipo intermedio se colocan en posiciones intermedias respecto a las equivalentes de los fenotipos rápido y lento. Además, la LDH-5 intermedia, presenta una banda más ancha que las correspondientes LDH-5

rápida y LDH-5 lenta. Todas estas consideraciones nos llevaron a formular la hipótesis de que el polimorfismo se debería a la existencia de dos tipos de subunidad M (una rápida y otra lenta), que estarían codificadas por dos alelos situados en el locus Ld-M y que presentarían dominancia intermedia como consecuencia de la asociación de los tres tipos de monómeros (H,M y M'), para formar los polímeros. La ausencia de bandas suplementarias se debería a la dificultad de resolución de diferencias de movilidad pequeñas entre la subunidad M y la M'. Los resultados obtenidos en los seis cruzamientos posibles realizados entre los tres fenotipos son coincidentes con la hipótesis planteada al no observarse en ningún caso diferencias significativas entre los datos observados en la descendencia y los esperados según un modelo mendeliano de dominancia intermedia para dos alelos del mismo locus génico.

La presencia de este polimorfismo, que parece deberse a las subunidades M en Discoglossus pictus, parece coincidente con dos de los pocos casos de variación en esta subunidad en los anuros, el de los géneros Bombina y Xenopus, ya que los tres géneros pertenecen al suborden de los opistocélidos.

El tipo de movilidad electroforética LDH propio del embrión no aparece sin embargo, en ninguno de los cruzamientos, hasta el final del desarrollo embrionario. Durante los primeros estados embrionarios (segmentación, gastrulación y neurulación) el fenotipo

LDH del embrión corresponde siempre al fenotipo materno. A partir del estado 27 (branquias externas, movilidad bucal y natación libre) comienza a visualizarse a nivel fenotípico el genotipo embriionario, el cual alcanza su aspecto definitivo en el estado 30, justo antes del inicio de la toma de alimento del medio externo. Estos resultados son probablemente consecuencia de la gran acumulación de material de reserva que tiene lugar durante la oogénesis de los anfibios. Este fenómeno ha sido estudiado en la LDH de los anfibios únicamente por Wright y Moyer (1968), quienes observaron un momento de expresión muy similar en Rana, ya que se inicia con el comienzo de la circulación sanguínea (estado 21) y se establece por completo también coincidiendo con el inicio de la alimentación. Wright (1975) ha podido comprobar también, mediante tratamiento con actinomicina-D y puromicina, que esta expresión tardía está mediada por la existencia de transcripción y traducción.

El estudio realizado en nuestro laboratorio sobre las frecuencias de los tres fenotipos LDH en dos zonas de captura, ha mostrado una distribución muy diferente. En la zona más contaminada y que presenta menor tensión de oxígeno en sus aguas, predominan los fenotipos rápido e intermedio, mientras que en la otra zona estudiada, abundan los fenotipos LDH intermedio y lento. Esto parece sugerir una relación entre el medio y las frecuencias fenotípicas, si la presencia de un tipo u otro de subunidad determinara una capacidad de adaptación diferencial a la hipoxia. El estudio realizado por nosotros con referencia a la K_M aparente para el piruvato, de la LDH 5 de los adultos rápidos y lentos y a la actividad

relativa de las cinco isoenzimas en los tres fenotipos en el estado VII, no ha podido detectar ninguna diferencia significativa en ninguno de los casos. De esta forma, parece que el tipo de movilidad no afecta a la afinidad de las isoenzimas por el piruvato ni a sus niveles de actividad en la larva. Esto hace pensar que, tratándose de dos poblaciones de tamaño relativamente pequeño, y aisladas, las diferencias en las frecuencias génicas para los alelos Ld-M y Ld-M' observadas en las dos zonas podrían deberse a fenómenos estocásticos como el efecto de fundadores o la deriva genética. Por otra parte, la comprobación que hemos realizado de que las frecuencias genotípicas, aunque diferentes, se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg en ambas zonas, es compatible con la presencia de apareamiento aleatorio entre los distintos fenotipos y la ausencia de migración, mutación o selección sobre este polimorfismo. Tampoco hemos detectado diferencias de viabilidad en los embriones y larvas de los distintos fenotipos obtenidos en los cruzamientos realizados, ni diferencias en la distribución de dichos fenotipos en los dos sexos en los animales adultos capturados.

Según los datos bibliográficos disponibles sólo tenemos referencia de un caso más en el que se haya estudiado el significado fisiológico y la distribución geográfica de un polimorfismo LDH en los anfibios. Así, los tres tipos LDH de Bombina, originados por la presencia de dos tipos de subunidades M, presentan distribuciones muy diferentes en siete poblaciones europeas situadas en zonas geográficas distintas, pero todas ellas muestran estar en

equilibrio Hardy-Weinberg. Las dos únicas poblaciones que mostraban frecuencias más altas del alelo menos frecuente, eran zonas muy diferentes desde el punto de vista ambiental. Los autores interpretan las diferencias de frecuencias en las distintas zonas como debidas a efectos de deriva o de fundadores.

En algunas especies de peces se ha encontrado sin embargo, un papel fisiológico para polimorfismos de la LDH. Así, en Pimephales promelas el fenotipo M'M' presenta una K_M por el piruvato a 25 y 30°C mayor que la de los otros dos fenotipos y su frecuencia pasa de ser abundante a ser casi nula en varias poblaciones naturales conforme la temperatura media durante la parte más calurosa del año en esas poblaciones pasa de 24 a 27°C (Merritt, 1972). En Salmo gairdneri se ha encontrado también una resistencia a la hipoxia diferente en los fenotipos $H^{2'}$ $H^{2'}$, y $H^{2''}$ $H^{2''}$ (Klar et al., 1979). Estudios actualmente en curso en nuestro laboratorio parecen mostrar sin embargo, una resistencia a la hipoxia similar en las larvas de Discoglossus pictus de los tres fenotipos. Estos datos, junto con los referentes a las frecuencias fenotípicas observadas, la actividad relativa de las isoenzimas y sus valores de K_M para el piruvato, parecen apuntar más bien hacia un papel neutral de este polimorfismo LDH.

Uno de los problemas más importantes concernientes a la evolución es la determinación de la cantidad real de variación genética que presentan las poblaciones. Según el punto de vista "clásico", la mayoría de los alelos de cualquier especie serían homo-

cigotos y el nivel de polimorfismo sería bajo. Sin embargo, la introducción de las técnicas electroforéticas en biología ha demostrado que la variabilidad a nivel molecular es grande y que el polimorfismo sería la regla en lugar de la excepción (Lewontin y Hubby, 1966; Harris, 1966; Selander, 1976; Lucotte, 1977). El polimorfismo a nivel de genoma sería aún mucho mayor, ya que las técnicas electroforéticas sólo detectarían las mutaciones del DNA que se transcribe y de estas, las que producen cambios de carga neta en las proteínas (22% aprox.), con lo que en conjunto los análisis electroforéticos sólo podrían detectar aproximadamente un 0,1% de la variación total (Powell, 1975).

La alta variación observada en las proteínas ha mostrado que es mayor en las enzimas con baja especificidad de substrato, y en las de especificidad alta es mayor en las reguladoras (Johnson 1974). También aumenta el grado de polimorfismo, al disminuir el tamaño corporal y la movilidad de la especie considerada (Levins, 1968), y al aumentar el tamaño de la proteína en cuestión (Koehn y Eanes, 1979). Sin embargo, la discusión más encarnizada respecto al polimorfismo bioquímico se refiere hoy en día a la existencia o no de significado fisiológico para la mayoría de la variación observada, concretándose la discusión entre un papel "neutralista" y un papel "seleccionista" de esta variación.

La teoría neutralista fue introducida por varios autores, especialmente por Kimura y Ohta (1971) y mantiene hoy en día que la mayoría de las variantes electroforéticas de las poblaciones

son proteínas casi equivalentes desde el punto de vista funcional y su mantenimiento se explica por fenómenos como la presión de mutación, el ligamiento con genes que sufren selección o la deriva genética. Los defensores de la teoría alternativa o seleccionista, suponen diferentes valores adaptativos para las distintas variantes proteicas. Los polimorfismos se mantendrían según estos autores debido a la existencia de heterosis (Berger,1976), a la selección dependiente de la frecuencia (Kojima,1971), a fluctuaciones ambientales a lo largo del tiempo o el espacio (Robertson y Reeve,1952; Gillespie y Langley,1974), a condiciones del ambiente genético (Ayala y Anderson,1973) o a la existencia de aditividad de los electromorfos con respecto a la actividad enzimática (Latter,1975). En cualquier caso, el estado actual del conocimiento en este campo, no permite definirse por ninguna de estas teo--rías como la única válida. De hecho en casi todos los casos las explicaciones neutralistas de los hechos observados pueden ser también explicadas desde un punto de vista seleccionista y vice-versa.

Recientemente, se ha propuesto un modelo en el que al principio de la diferenciación de dos alelos estos serían neutros debido a la homeostasis, pero conforme avanzase su divergencia la selección comenzaría a actuar, pudiendo llegarse al final a la eliminación o a la fijación de las distintas variantes (Bargiello y Grossfield,1979). Nuestro caso del polimorfismo LDH en Discoglo-ssus pictus puede aportar muy poco a esta discusión general, ya que se trata de un sólo locus, estudiado en una sólo especie y

los parámetros medidos en las distintas variantes son también limitados. Sin embargo, creemos que este caso concreto refleja la importancia tanto de la teoría neutralista como de la seleccionista. Parece probado que los dos genes básicos de la LDH, Ld-H y Ld-M, tienen un origen común. Su divergencia a lo largo de los millones de años de la evolución orgánica ha llevado a la diferenciación funcional, que parece hoy probada, de lo que en su día fueron tal vez variantes más o menos equivalentes. De hecho la revisión de la evolución de estos genes por Markert (1975) parece apoyar esta divergencia progresiva. No sería pues extraño, el encontrar un carácter neutro a polimorfismos como el observado por nosotros, que al estar confinados a nivel de especie son mucho más recientes en la escala del tiempo.

El estudio realizado sobre la K_M aparente en Discoglossus pictus, no ha mostrado variaciones al comparar los fenotipos rápido y lento de LDH-5. Este resultado concuerda con las observaciones realizadas en las subunidades H de los ránidos, que presentan una variabilidad electroforética e inmunológica grande que no está acompañada por variaciones significativas en la K_M (Levy y Salthe 1971). Esto sugiere que las diferencias en la estructura primaria de las variantes polimórficas no afectan a la afinidad de la enzima por el substrato quizás por no modificar substancialmente el centro activo o por no alterar la afinidad por la estructura particulada celular.

Las K_M aparentes para el piruvato de la LDH-5 (de ambos tipos)

y de la LDH-1, sí mostraron diferencias calificables de significativas variando desde 0,31-0,32 mM (piruvato) hasta 0,15 mM (piruvato) respectivamente. Esta diferencia de afinidad por el sustrato (piruvato) entre la LDH-5 y la LDH-1 concuerda con los datos de otras especies. Se han obtenido diferencias de este orden de magnitud en la mayoría de las especies estudiadas. Así, la K_M (piruvato) del corazón de hamster es 0,13 mM y en el músculo esquelético de esta misma especie es 0,38 mM (Walden y Schiller, 1980). En Rana pipiens se ha obtenido también un valor de 0,15 mM para la LDH-1 y de 0,27 mM para la LDH-5 (Levy y Salthe, 1974).

Para que la "teoría aerobia-anaerobia" pueda tener aplicabilidad in vivo, es preciso además que exista un rango de concentración de sustrato en el cual la LDH-1 esté siendo ya inhibida mientras que la LDH-5 presente su actividad máxima o ésta vaya en ascenso. Los datos obtenidos por los autores arriba citados, sitúan este margen entre 0,6 mM y 1,0 mM para Rana pipiens. Nuestros datos muestran un margen similar con una acotación superior más alta en Discoglossus pictus, entre 0,68 mM y 2,72 mM (piruvato). Esto supone un ancho margen en el que la LDH-1 estaría inhibida pero no lo estaría la LDH-5. Faltaría saber si las concentraciones tisulares que se dan in vivo caen dentro de este margen, para que la teoría tuviese significado fisiológico. Los estudios realizados parecen confirmar este punto ya que el músculo activo de Rana alcanza una concentración superior a 0,7 mM piruvato en condiciones de normoxia a 20°C (Sacks et al., 1954) y en condiciones de hipoxia o actividad forzada se pueden alcanzar concentraciones su

periores. Se han extrapolado también los valores del margen de inhibición de la LDH-1 y la LDH-5 antes citado para una temperatura de 10°C. En estas condiciones, se ha comprobado en Rana palustris que el efecto directo de la temperatura y el aumento de pH (mediado por el descenso de temperatura) sobre la K_M , son opuestos y de igual intensidad en las dos isoenzimas. De esta forma, las relaciones relativas de inhibición de la LDH-1 y la LDH-5 con respecto al substrato se mantienen y el margen de inhibición alcanzado coincide con el nivel de piruvato observado in vivo (Salthe, 1975). Así, tanto en condiciones semi-cálidas (20-25°C), como frías (10°C), los resultados obtenidos en Discoglossus y en Rana serían compatibles con la "teoría aerobia-anaerobia" del papel fisiológico de las isoenzimas LDH. Por otra parte, los resultados parecen ser comparables en las distintas especies, ya que se han obtenido valores de substrato (piruvato) óptimo entre 1,2 y 1,4 mM en larvas de especies como Xenopus laevis, Triturus alpestris y Ambystoma mexicanum, mientras que nosotros hemos obtenido un valor de 1,36 mM piruvato para las larvas de Discoglossus pictus.

La relación entre el consumo de oxígeno y la tensión de oxígeno ambiente en las larvas activas de Discoglossus pictus ha permitido observar un comportamiento regulador a tensiones mayores a los 35 mm Hg de O_2 . Los pocos estudios realizados en otras especies de anfibios durante la vida larvaria son coincidentes en este punto, citando tensiones de oxígeno críticas para el paso de la etapa reguladora a la conformista, de 35 a 38 mm Hg de O_2 (Helff y Stubblefield, 1931; Bond, 1960; Boell, 1963). El comporta-

miento regulador se ha atribuido a un aumento de la ventilación branquial (Boell, 1963; Weigmann y Altig, 1975) y en nuestro caso esto es aún más probable ya que se ha eliminado la posibilidad de toma de aire de la fase gaseosa, comportamiento que está aumentado en hipoxia (Branch y Taylor, 1977). Entre los 347 mm Hg O_2 y los 150 mm Hg O_2 no se observaron cambios de consumo de oxígeno excepto en la medida por larva, efecto que puede deberse al tamaño mayor de los animales del primer grupo, ya que no hubo cambios de consumo de oxígeno por unidad de peso. Entre 150 mm Hg O_2 y 119 mm Hg de O_2 ambiente, hubo un descenso significativo y a partir de esta tensión de O_2 y hacia abajo, comenzó la fase reguladora. Este efecto, la existencia de una etapa conformista anterior a la reguladora, se ha observado en otras especies (Laurent, 1975; Wares e Ingram, 1979) y podría significar una ausencia de respuesta compensadora mientras que la tensión de oxígeno no alcance un valor lo suficientemente bajo. Además, el valor de tensión de oxígeno en el que se inicia la regulación, 119 mm Hg, parece corresponder a las condiciones de hipoxia moderada en las que frecuentemente se encuentran las larvas de Discoglossus pictus en condiciones naturales, por lo que es de esperar un inicio de regulación sólo por debajo de esta normoxia relativa.

Los mismos grupos de larvas utilizados para medir el consumo de oxígeno en condiciones de actividad espontánea, mostraron una desaparición de la respuesta reguladora al ser anestesiados con M S-222. En estas condiciones el consumo de oxígeno y la tensión de oxígeno ambiente mostraron una proporcionalidad lineal directa.

Esto apoya la suposición de que la regulación está basada en una respuesta hiperventilatoria mediada por el sistema nervioso, el cual se encontraría deprimido durante la anestesia. Además, el M S-222 es un anestésico soluble en los lípidos que pasa al torrente circulatorio, equilibrándose con muchos tejidos y especialmente con el fluido cerebro-espinal (Stenger y Maren, 1974). Provoca inactivación de los quimiorreceptores para el oxígeno y también puede afectar la respuesta ventilatoria por inactivación neuromuscular en los músculos motores de la ventilación. Según un trabajo reciente, impediría la respuesta ventilatoria en los peces inhibiendo la sensibilidad de los receptores para el oxígeno, especialmente los periféricos (Daxboeck y Holeton, 1980).

La tasa de descenso del consumo de oxígeno es aproximadamente constante en los animales anestesiados entre 249 y 63 mm Hg O₂ ambiente, pero entre este último valor y 41 mm Hg O₂ el descenso es menos acusado, resultando no significativo. Quizás el estímulo de tensiones de oxígeno muy bajas podrían estar produciendo un inicio de regulación, ya que se ha observado que el efecto inhibitor de esa regulación debido al M S-222, es dependiente de la dosis empleada (Daxboeck y Holeton, 1980) y nosotros hemos empleado dosis mínimas. No se puede descartar, sin embargo, la posibilidad de que la ausencia de diferencias significativas en este caso se deba a la existencia de desviaciones altas respecto a los valores medios, combinadas con un margen estrecho de tensión de oxígeno en la comparación de valores pequeños de consumo. Es también muy interesante resaltar la coincidencia del valor de consumo de oxígeno en _

las larvas activas medidas a 35 mm Hg O_2 y en larvas anestesiadas medidas a 146 mm Hg O_2 . Esto significa que en las condiciones de hipoxia extrema utilizadas por nosotros en los experimentos de aclimatación, la tasa de consumo de oxígeno corresponde aproximadamente a un nivel basal en ausencia de actividad. Esto concuerda también con la imposibilidad de reducir aún más esa tasa basal, hecho que se observa al producirse la muerte en larvas no anestesiadas, por debajo de 29 mm Hg de oxígeno ambiente.

Por otra parte, el consumo de oxígeno en larvas activas medido a tensiones de oxígeno ambientales a las que los animales habían sido aclimatados durante catorce días, produjo resultados similares a los obtenidos en larvas no aclimatadas. No hubo diferencias de consumo de oxígeno entre los grupos de normoxia e hiperoxia pero sí entre estos dos grupos y el de hipoxia extrema. La relación del consumo en normoxia con respecto al de hipoxia extrema, fué sin embargo mayor en los animales aclimatados que en los no aclimatados, alcanzándose un valor de 6 a 6,3 en el primer caso y de 4,6 a 4,7 en el segundo. Esto sugiere que durante la aclimatación se producen cambios a otros niveles fisiológicos, que permiten disminuir el consumo de oxígeno (y por tanto la hiperventilación hipóxica), sin provocar la muerte del animal. Está de acuerdo con esto el hecho de que aún con una hiperventilación supuestamente mayor, el animal no aclimatado no vive más de 24 horas el ser transferido bruscamente desde un ambiente normóxico a uno de hipoxia extrema. De hecho, la aclimatación a la hipoxia extrema la hemos realizado siempre precedida de un período

de preaclimatación a la tensión de oxígeno progresivamente decreciente. Este período de preaclimatación previa pone probablemente en marcha otros mecanismos fisiológicos o bioquímicos que permiten la supervivencia a un nivel de consumo de oxígeno más bajo que el que se observa en un stress hipóxico. Quizás se deba esto, al menos en parte, al coste energético alto de una hiperventilación elevada, la cual tendría un papel importante sólo en períodos cortos de hipoxia aguda. En cualquier caso, estas consideraciones están limitadas por el hecho de basarse en medidas efectuadas en estados del desarrollo diferentes aunque cercanos. En otro orden de cosas conviene resaltar que el consumo de oxígeno referido al peso del animal proporciona datos con un coeficiente de variación menor y en el caso de las larvas anestesiadas una regresión mejor entre el consumo de oxígeno y la tensión de oxígeno ambiente. Esto es lo que cabría esperar, ya que la masa corporal altera el consumo de oxígeno de cada individuo.

La aclimatación de las larvas de Discoglossus pictus durante 15 días a condiciones de hipoxia extrema (37,3 mm Hg O₂), hipoxia moderada (89,5 mm Hg O₂), normoxia (149,1 mm Hg O₂) e hiperoxia (710 mm Hg O₂) produjo cambios en parametros comportamentales, morfológicos, ultraestructurales y bioquímicos, en algunos de los grupos.

El estudio al microscopio electrónico de la musculatura estriada de las larvas en el estado XIV mostró en el grupo aclimatado a hiperoxia alteraciones muy acusadas en el aparato mitocondrial.

La matriz interna aparece muy vacuolizada, con pérdida de densidad a los electrones, debido a la degeneración de las crestas. También hay roturas aunque menos acusadas, en la membrana externa mitocondrial y a veces se observa un aumento del tamaño de estos orgánulos, especialmente en los que presentan un grado más avanzado de degeneración. La vacuolización de las mitocondrias ha sido observada también, en las células alveolares del pulmón de mamíferos expuestos a oxígeno puro (Schulz, 1958). Parecen existir también daños aunque no tan acusados, en las membranas del retículo endoplásmico. Este hecho es coincidente con uno de los efectos más conocidos de la exposición de las células a tensiones de oxígeno altas, la peroxidación de los fosfolípidos, que producen daños en las membranas (Tappel, 1973; Frank y Massaro, 1980). Sin embargo, si esta degradación de las membranas se debiese a la peroxidación de los fosfolípidos de las mismas, cabría preguntarse porqué afectaría con más intensidad a la membrana mitocondrial interna, menos intensamente a la membrana mitocondrial externa y a la del retículo y dejase inalterada morfológicamente a la membrana plasmática. Pensamos que esta diferencia de sensibilidad a la hiperoxia podría deberse a diferencias en la relación fosfolípidos/colesterol en las distintas membranas celulares. Se supone desde hace tiempo que el papel del colesterol consistiría en formar complejos con las cadenas hidrocarbonadas no polares de los fosfolípidos, produciendo así una estabilización de los lípidos en la membrana (Vandenheuvel, 1963; Diaz-Flores et al., 1974). Las distintas membranas antes citadas presentan distintos valores de la relación fosfolípidos/colesterol, que es en la mayoría de

las especies estudiadas aproximadamente de 2 a 3 para la membrana plasmática, de 4 a 15 para el retículo endoplásmico, de 15 a 20 para la membrana mitocondrial externa y 53 para la membrana mitocondrial interna (Wolfe,1972; Maillet,1975; Avers,1976). Así, las membranas celulares con menor proporción de colesterol respecto al total de fosfolípidos, al ser menos estables, serían más sensibles a la peroxidación de los fosfolípidos que se produce en condiciones de hipoxia, con lo que se explicarían los resultados observados.

La aclimatación a hipoxia extrema no produjo la tumefacción o turgescencia mitocondrial que es una respuesta característica debida a la falta de oxígeno (Díaz-Flores et al.,1974; Maillet,1975). Se ha mostrado sin embargo, que esta alteración mitocondrial sólo se produce cuando la tensión de oxígeno tisular es muy baja. Así, no se han obtenido alteraciones mitocondriales al cultivar fibroblastos y células epiteliales humanas en 23 mm Hg O_2 , y en el músculo de rata es preciso descender a 7 mm Hg de O_2 para obtener la bilidad mitocondrial (Schroeder,1975; Wenz et al.,1975). Es proba ble que la hipoxia extrema aplicada por nosotros no sea lo sufi-- cientemente aguda como para producir estas alteraciones mitocon-- driales debido a su valor en el ambiente, 37,3 mm Hg O_2 , y a que el músculo caudal es un tejido muy capilarizado en las larvas de anfibios y en contacto muy estrecho con el medio acuoso del cual puede obtener oxígeno directamente por difusión gracias a la permeabilidad de la piel. Por otra parte, una de las respuestas comportamentales que observamos en el grupo de hipoxia extrema, el

descenso marcado de actividad espontánea en el músculo, produce un gasto energético menor, con menor demanda de ATP. Esta necesidad disminuída de ATP no supone así probablemente la exigencia de un metabolismo aerobio por encima de las disponibilidades de oxígeno del tejido, lo cual explicaría también la estabilidad de las mitocondrias. Sí hubo sin embargo, en este grupo de animales, una hidropesia del retículo endoplásmico así como del espacio perinuclear que está relacionado con él. Esta situación ha sido descrita como un cuadro típico en situaciones de alteración del equilibrio hídrico intracelular, de forma que el agua penetraría en los espacios intermembranosos del retículo y la membrana nuclear (Díaz-Flores et al., 1974). Se ha sugerido que estas alteraciones del equilibrio hídrico en hipoxia se deberían a un descenso del pH intracelular (Farrell, 1972), situación que podría producirse en nuestro caso debido a una elevación de los niveles de lactato en el grupo de hipoxia extrema como consecuencia de un metabolismo anaerobio acentuado en el organismo.

Además de observarse un descenso de la actividad espontánea antes descrita, las larvas del grupo de hipoxia extrema mostraron un aumento de la toma de aire y pasaban la mayor parte del tiempo en la capa superior de agua, que en condiciones naturales es la que presenta mayor contenido de oxígeno. Este comportamiento es coincidente con el observado por otros autores en condiciones de hipoxia en anfibios (Branch y Taylor, 1977) y peces (Tramer, 1977; Gee et al., 1978) y no se presentó en los demás grupos de aclimatación. El grupo aclimatado a la hiperoxia mostró, sin em-

bargo un incremento marcado de la ingestión de alimento, el cual se suministró siempre en exceso. Esta es probablemente la causa del tamaño y peso significativamente mayor de las larvas del grupo hiperóxico con relación a los otros tres grupos, los cuales no presentaron diferencias significativas en el tamaño ni diferencias observables en la ingestión de alimento. El aumento de tamaño en el grupo hiperóxico, se produjo en todas las regiones del cuerpo medidas y fue aproximadamente de un 15%. Este aumento de tamaño y peso no estuvo relacionado sin embargo, con alteraciones en la morfogénesis, ya que todos los grupos se encontraban en el mismo estado del desarrollo al final de todos los periodos de aclimatación a las distintas tensiones de oxígeno.

Se ha propuesto un papel fisiológico diferente para las dos isoenzimas básicas de la LDH, la LDH-1 (H_4) y la LDH-5 (M_4), proposición que se recoge en la llamada "teoría aerobia-anaerobia". Esta teoría se basa fundamentalmente en las diferencias en la distribución por tejidos, en la inhibición por substrato y en la afinidad por la fracción particulada celular, en la LDH-1 y la LDH-5. La aplicabilidad de esta teoría parece ser generalizable en términos evolutivos aunque ha sido criticada fundamentalmente por la distribución isoenzimática en los eritrocitos y en el hígado (Fine et al., 1963) y por la suposición de que la inhibición por substrato se produciría in vitro pero no in vivo (Vesell, 1965). Estos argumentos contrarios a la teoría, normalmente limitados a casos concretos, han sido contestados más recientemente por varios au-

tores (Ogihara,1975; Everse y Kaplan,1975; Salthe,1975).

Si el papel diferencial de las isoenzimas LDH-1 y LDH-5 en relación con los metabolismos aerobio y anaerobio parece haber sido establecido durante la evolución en relación con la especialización orgánica, no es tan claro su funcionamiento en la aclimatación fisiológica a las fluctuaciones de tensión de oxígeno ambiente. Los datos obtenidos en especies buceadoras o que viven en las grandes alturas apoyan la teoría, pero se trataría aquí también de adquisiciones evolutivas. Por eso, se han realizado experimentos de aclimatación fisiológica, principalmente a situaciones de hipoxia, para elucidar si el sistema LDH puede responder de una forma adaptativa compatible con la teoría. La mayoría de las experiencias, realizadas sobre todo en aves y mamíferos, han dado resultados positivos, produciéndose normalmente un aumento de subunidades de tipo M en los tejidos estudiados como respuesta a la hipoxia (Penney,1974; Chvapil,1976; Binette et al.,1977). En aquellos casos en los que no se obtuvo respuesta en el patrón de isoenzimas LDH (Broniszewska y Wroblewski,1975; Shaklee et al.,1977), este resultado parece deberse a la aplicación de hipoxias moderadas o al tiempo corto de exposición.

En los anfibios no tenemos datos bibliográficos referentes al efecto de la tensión de oxígeno sobre las isoenzimas LDH durante la aclimatación, aunque los estudios realizados en varias especies sobre las características cinéticas de las isoenzimas y su sensibilidad a la inhibición por substrato en los adultos parecen

apoyar la "teoría aerobia-anaerobia" (Salthe, 1966, 1975). No sería de extrañar que los anfibios siguiesen un modelo de respuesta a este nivel, semejante al de los homeotermos, ya que estos grupos, a diferencia de lo que ocurre en invertebrados y algunos peces, no presentan vías anaerobias alternativas a la formación de lactato.

Los experimentos realizados por nosotros en las larvas de Discoglossus pictus no han mostrado diferencias en la actividad global de la LDH después de la aclimatación a condiciones de hipoxia extrema o hiperoxia con respecto a los controles (normoxia). Sólo se detectó un aumento significativo en la actividad total LDH del grupo de hiperoxia. Este aumento es perfectamente achacable al tamaño significativamente mayor de las larvas de este grupo, ya que la actividad específica LDH referida a proteínas no presentó variación respecto al control. Este resultado es concordante con el otro único caso de aclimatación a la tensión de oxígeno realizado en embriones, en el que se obtuvieron cambios en el patrón de isoenzimas LDH sin existir variaciones en la actividad total de la enzima. Esto sugiere que los tejidos embrionarios tendrían una capacidad mayor de regulación, pudiendo variar el grado de expresión de los genes Ld-H y Ld-M, obteniendo un aumento relativo de subunidades M sin necesidad de incrementar la actividad total de la enzima (Lindy y Raja-salmi, 1966). No se puede descartar, sin embargo, una regulación a otros niveles, como podría ser variando la tasa de degradación de las isoenzimas, su inactivación selectiva o variando la asociación entre las subunidades. En el caso de los

mamíferos adultos se suele encontrar sin embargo, un aumento de la actividad específica LDH simultáneo al aumento de las subunidades M (Penney,1974; Chvapil,1976). En este último caso no se puede decir si este aumento en porcentaje se debe a variaciones en ambos tipos de isoenzimas (ricas en subunidades M o subunidades H), o a variaciones en uno sólo de estos tipos.

La aclimatación a la hipoxia moderada no produjo cambios en el patrón de isoenzimas en las subunidades H o M, tanto en el animal completo como en el hígado. Sí hubo variaciones sin embargo, en el hígado de las larvas aclimatadas a hipoxia extrema, que presentaron un aumento en la LDH-5, en las subunidades M y en la relación M/H, mientras que descendían la LDH-4 y 2. Los grupos de hiperoxia y normoxia no presentaron diferencias significativas entre sí, aunque los cambios observados parecen ser opuestos a los de la hipoxia extrema, ya que baja la LDH-5 y las subunidades M y suben la LDH-4,2 y 1. Esto supone globalmente una relación directa, aunque no lineal, entre la tensión de oxígeno de aclimatación y la relación de subunidades H/M que concuerda plenamente con la teoría aerobia-anaerobia. El hígado de las larvas sujetas a hipoxia extrema reacciona con un aumento del 39% en la relación M/H que resultaría favorable en estas condiciones según la teoría. Este resultado concuerda así con los datos obtenidos anteriormente en mamíferos adultos y especialmente con los observados en embriones de aves. Hay que resaltar también que los datos obtenidos en hipoxia moderada en el hígado, aunque no significativos, van en el mismo sentido que los de hipoxia ex-----

trema, es decir, aumenta la LDH-5 y disminuyen las demás isoenzimas en hipoxia. El bajo nivel de hipoxia explica así la falta de detección de diferencias significativas, lo que explica también los resultados obtenidos por otros autores al aplicar niveles suaves de hipoxia. Sería así necesario aplicar un nivel de oxígeno cercano a la tensión crítica de la especie en cuestión para observar una respuesta del sistema isoenzimático LDH. Esto parece por otra parte lógico, ya que a tensiones de oxígeno superiores a dicha tensión crítica, otros mecanismos fisiológicos como la hiperventilación, son capaces de compensar el déficit de oxígeno en el medio. Es obvio que mientras no se logre una verdadera hipoxia celular no puede haber aclimatación molecular en los tejidos.

Por otra parte, el descenso tan marcado de la LDH-2 en hipoxia extrema es coincidente con observaciones previas que demuestran la alta sensibilidad de esta isoenzima a factores como la temperatura en Discoglossus pictus (de Costa, 1973, 1978). La LDH-2 es también la única isoenzima que no aparece en ningún tejido de Rana ridibunda (de Costa et al., 1978) y se ha demostrado en los teleosteos que los heteropolímeros asimétricos $M_1 H_3$ (LDH₂) y $M_3 H_1$ (LDH₄) son mucho más inestables que los homopolímeros o el heteropolímero simétrico $M_2 H_2$ (LDH₃), debido probablemente a un menor número de interacciones entre las subunidades (Shaklee, 1975). Esto es además coincidente con el hecho de que en nuestros resultados la LDH-2 presenta normalmente valores inferiores a los esperados según una distribución binomial de las subunidades H y M y

su coeficiente de variación es el más alto del de todas las isoenzimas.

La comparación cuantitativa de los patrones isoenzimáticos LDH de las larvas control entre los estados XIV y XXV, muestra variaciones muy significativas concretadas en un descenso de las subunidades M, debido a un aumento de la LDH-1 y 2 y a un descenso de la LDH-4 y 5. Esto concuerda también con la "teoría aerobia-anaerobia" ya que en el estado XXV ha terminado la metamorfosis pasándose a la vida aérea, medio en el que la tensión de oxígeno no desciende normalmente a valores bajos como ocurre en el medio líquido.

La aclimatación a la tensión de oxígeno ambiente también produjo diferencias en el patrón de isoenzimas y subunidades LDH del músculo caudal, en el grupo de hipoxia extrema con respecto a los de normoxia e hiperoxia. Estos dos últimos grupos no presentaron diferencias entre sí. En el grupo de hipoxia extrema se pudo observar un aumento significativo de la LDH-2 y la LDH-3 y un descenso también significativo de las subunidades M y de la LDH-5. Para la interpretación de estos resultados hay que tener en cuenta los estudios microscópicos e histoquímicos realizados en larvas de anfibios (Watanabe, 1969; Sasaki, 1977, 1979). Según estos autores, el músculo caudal de los anfibios está compuesto de un músculo rojo, de disposición periférica, rico en subunidades H y de un músculo blanco, de disposición interna, más rico en subunidades M. Además, conforme el desarrollo avanza durante la prome-

tamorfosis, va aumentando progresivamente el porcentaje de subunidades M del músculo en su conjunto, quizás debido a un predominio cada vez mayor de las fibras internas. Este aumento de subunidades de tipo M conforme la larva se acerca al clímax ha sido comprobado también en Discoglossus pictus (Alonso et al., 1976). Así, el aumento de subunidades H que se observa en el grupo de hipoxia extrema podría representar un retraso en este grupo, de los cambios que normalmente se dan en el patrón de isoenzimas de la LDH. Este retraso podría estar relacionado con el gran descenso de funcionalidad del músculo, originado por la disminución acusada de actividad motora que ocurre en las larvas hipóxicas, o con el acceso más directo de las fibras periféricas al oxígeno, de los medios externo y sanguíneo.

Por otra parte, el músculo de las larvas de anfibios no parece corresponder al modelo típico de metabolismo altamente anaerobio, debido a la presencia de fibras rojas y blancas, y a la presencia de un patrón de isoenzimas LDH calificable de intermedio en el grupo normóxico, con un alto porcentaje de subunidades H. Además, se ha propuesto recientemente un modelo de ajuste metabólico a la hipoxia, basado en los datos existentes en la actualidad, en Carassius auratus. En él, los órganos que precisan mantener su tasa metabólica al menos a un nivel mínimo durante la hipoxia, producirían lactato de forma anaerobia, el cual pasaría a la sangre y sería metabolizado en el músculo rojo hasta varios productos finales a través del acetyl-Co A. Con esto se evitaría un descenso del pH sanguíneo en períodos de hipoxia prolongada

(Hochachka,1980). En esta situación, un aumento de subunidades H sería favorable, ya que facilitaría la conversión del lactato en piruvato. Esta situación sería compatible con el caso de las larvas hipóxicas de Discoglossus pictus, ya que el descenso de actividad muscular supondría una disminución local importante de las necesidades energéticas, y la situación periférica de las fibras ricas en subunidades H les permitiría un acceso más directo al oxígeno del medio, el cual sería necesario en caso de que el destino final del piruvato fuese su oxidación completa a dióxido de carbono y agua. En cualquier caso, los datos disponibles no nos permiten decidir si estos mecanismos están operando realmente in vivo, por lo que su valor sería el de especulaciones que podrían ser válidas para el planteamiento de nuevas hipótesis de trabajo.

Los datos referentes a la actividad total y específica de la LDH durante el desarrollo embrionario han mostrado un pico máximo de actividad LDH durante la gastrulación, que supone un 44-70% de aumento con respecto al huevo fecundado. Estos resultados son coincidentes con los realizados en otras especies de anfibios como Xenopus laevis, Ambystoma mexicanum o Triturus alpestris, en los que también se ha encontrado un máximo de actividad LDH durante la gastrulación. La existencia de un metabolismo glucolítico alto en el embrión de anfibios, y especialmente durante la gastrulación, se ha propuesto desde hace tiempo basándose en medidas indirectas, como la velocidad de desaparición de glucógeno en el labio dorsal (Woerdeman,1933a), medidas del cociente respiratorio (Brachet,1934), o estudios sobre el sustrato utilizado como fuen-

te de energía (Gregg y Ballentine, 1946; Løvtrup, 1959). La presencia de un metabolismo anaerobio en los primeros estados parece estar reforzada por la tendencia de los embriones iniciales a formar cúmulos con sus envueltas gelatinosas. Savage (1935) midió la tensión de oxígeno en Rana temporaria observando una tensión de oxígeno de 202 mm Hg en el agua a 50 cm de distancia del cúmulo de embriones y de 4,8 mm Hg en el interior de estas masas agregadas. El pH también pasó de 7,6 afuera a 6,8 en el interior de los cúmulos de embriones.

Se ha observado también formación de lactato en la gástrula de Rana y de Bufo en condiciones anaerobias (Barbieri y Salomón, 1963) y aerobias (Gregg et al., 1964). En un principio se quiso asociar la actividad glucolítica alta con el fenómeno de la inducción neural, pero hoy día se piensa más en una relación con los movimientos morfogenéticos de la gastrulación (Jaeger, 1945; Boulekbache et al., 1971). Se ha realizado una crítica reciente (Løvtrup, 1978) basada en que el lactato sería un inhibidor de la gastrulación, pero las concentraciones necesarias para que este efecto se produzca son mucho mayores a las que se producen in vivo. Los datos referentes a la actividad LDH y a su localización en la gástrula de Discoglossus pictus parecen apoyar así la existencia de una tasa glucolítica alta en el labio dorsal, que aportaría energía para los movimientos de la gastrulación. Se ha encontrado también un resultado similar en la gástrula de Pleurodeles Waltlii (Boulekbache y Barja de Quiroga, 1981). En esta misma especie se ha encontrado también la misma disposición perinu-

clear de la LDH en la mórula que se da en Discoglossus pictus. Esta disposición está probablemente relacionada con la disposición perinuclear de glucógeno en este estado, que se ha observado en mamíferos (Dalcq, 1952), en Discoglossus pictus (Klag y Ubbels, 1975) y en Rana (Brachet y Malpoix, 1971).

El estudio realizado sobre el efecto del oxamato sódico durante el desarrollo embrionario ha mostrado su detención a concentraciones superiores a 1 mM. Se ha demostrado que el oxamato es un inhibidor competitivo de la LDH con respecto al piruvato (Novoa et al., 1959; Hochachka, 1975) y estudios realizados sobre cultivos celulares han mostrado que el oxamato inhibe específicamente la glucólisis anaerobia sin afectar al metabolismo oxidativo. Tampoco se produce competición con la piruvato quinasa ni con el complejo de la piruvato deshidrogenasa (Papaconstantinou y Colowick, 1961). Si esto es así, y su efecto se limita solo a su acción a nivel de la LDH, nuestros resultados en este sentido serían concordantes con los de actividad y localización de la enzima. La existencia de un cierto grado de metabolismo anaerobio sería esencial para el desarrollo, ya que su supresión provoca la detención de éste último. Por otra parte, se ha demostrado también que el oxamato detiene el desarrollo embrionario en la gástrula de Salmo irideus (Boulekba-che et al., 1971) y es un inhibidor competitivo de la LDH de Rana pipiens tanto muscular como cardíaca y del testículo (Goldberg y Wuntch, 1967).

El que la detención del desarrollo en Discoglossus pictus sea

debida a una inhibición competitiva de la LDH, coincide con la reversión del proceso al pasar los embriones a agua normal al cabo del tiempo letal 50 de estar en una solución de oxamato. Además, la adición de piruvato a una concentración igual a la de oxamato no inhibe el desarrollo embrionario ni su velocidad, mientras que la adición de piruvato a una concentración menor no impide dicha detención del desarrollo, lo cual apoya también que el efecto del oxamato se produzca por inhibición competitiva de la LDH respecto al piruvato. Así, si como parece, el oxamato es un inhibidor competitivo y específico de la LDH, la actividad de esta enzima parece ser esencial para la realización del desarrollo embrionario en Discoglossus pictus.

El estudio de las variaciones de la actividad LDH durante la vida larvaria nos ha mostrado un aumento notable de dicha actividad tanto total como específica durante la pre y prometamorfosis, para llegar a un máximo que se mantiene durante el clímax metamórfico, y descender luego en el joven recién metamorfoseado. No se han realizado estudios de este tipo en otras especies de anfibios, pero otros datos parecen ser coincidentes con estos resultados. Por una parte, el consumo de oxígeno, a pesar de la gran cantidad de tiroxina en sangre, descende con la llegada del clímax metamórfico, hecho que se ha comprobado en numerosas especies como Xenopus laevis, Rana temporaria, Rana catesbeiana, Bufo vulgaris o Discoglossus pictus (Etkin, 1934; Fletcher y Myant, 1959; Funkhoser y Mills, 1969; Peris, 1977). Si se toma el aumento de actividad LDH como representativo de un metabolismo anaerobio más acusado, éste

metabolismo compensaría al menos en parte el descenso observado en el consumo de oxígeno, en un momento como es el clímax en el que tiene lugar un grán gasto energético debido a reestructuraciones morfogénéticas. Se ha comprobado además que durante el clímax, período en el que no hay ingestión de alimento, se da una glucolisis muy acelerada, a expensas del glucógeno que se había almacenado durante la vida larvaria. Así, la mayor parte de la energía consumida durante el clímax en Alytes obstetricans, Xenopus laevis o Rana pipiens (Beaumont, 1960; Hanke y Leist, 1971; Farrar, 1973) proviene de la degradación del glucógeno. Esta glucolisis sería al menos en gran parte anaerobia, como parecen sugerir los aumentos de actividad LDH y el descenso de consumo de oxígeno. Al final del clímax cesa esta glucolisis intensa, aumenta el consumo de oxígeno, y desciende la actividad LDH, pasando a la respiración en el aire, medio más rico en oxígeno que el acuático.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- El polimorfismo observado en la movilidad electroforética de las isoenzimas LDH en Discoglossus pictus está controlado por dos alelos situados en el mismo locus, que presentan dominancia intermedia. Estos dos alelos originarían dos tipos de subunidad, M y M', que serían las causantes de la diferencia de movilidad.
- 2.- Se ha observado una expresión tardía del genotipo LDH embrionario, localizada entre los estados 27 y 30. Este hecho se ha relacionado con la gran acumulación de material de reserva que ocurre durante la oogénesis en los anfibios.
- 3.- Los estudios realizados sobre las frecuencias fenotípicas en las poblaciones, los parámetros cinéticos y los datos de actividad relativa de las isoenzimas, no permiten atribuir papeles fisiológicos diferentes a los distintos tipos polimórficos de la LDH.
- 4.- Los valores de la K_M aparente para el piruvato y los niveles de inhibición por substrato, para la LDH-5 y la LDH-1, son compatibles con la teoría aerobia-anaerobia de un papel fisiológico distinto de las subunidades H y M.

- 5.- Las larvas de *Discoglossus pictus* presentan un comportamiento regulador respecto al oxígeno en hipoxia moderada y un comportamiento conformista en hipoxia extrema. En presencia del anestésico MS-222 el comportamiento es siempre conformista y proporcional a la tensión de oxígeno. Se ha relacionado el comportamiento regulador con variaciones ventilatorias mediadas por receptores del oxígeno.
- 6.- La aclimatación a la hipoxia aumenta la resistencia a la exposición a tensiones de oxígeno bajas.
- 7.- La aclimatación a tensiones de oxígeno tanto altas como bajas produce alteraciones en la ultraestructura del músculo caudal, mostrando que la hipoxia extrema y la hiperoxia alcanzan el nivel tisular. Se han relacionado las alteraciones en hiperoxia con la peroxidación de los fosfolípidos de las membranas.
- 8.- La aclimatación a la hiperoxia produce un aumento significativo del tamaño y el peso de las larvas sin alterar la tasa de desarrollo. Esto se ha relacionado con el aumento de ingestión de alimento que se produce en el grupo de hiperoxia.
- 9.- No se producen cambios significativos en la actividad específica de la LDH durante la aclimatación a hipoxia extrema o hiperoxia.

- 10.- La aclimatación a hipoxia moderada no produce cambios signi
ficativos en el patrón de isoenzimas LDH del hígado, mien--
tras que la aclimatación a hipoxia extrema produce un aumen
to significativo de la LDH-5 y las subunidades M. Este resul
tado supone una variación en la actividad tanto de las sub-
unidades H como de las M, ya que no hubo variaciones en la
actividad total y específica de la enzima. Estas variacio--
nes se han relacionado con la existencia de aclimatación en
el sistema LDH con respecto a la tensión de oxígeno.
- 11.- El patrón de isoenzimas LDH del hígado de los animales mues
tra un descenso significativo de subunidades M al final de
la metamorfosis con el paso a la respiración aérea, respec-
to a las larvas prometamórficas de vida acuática. Este re--
sultado es también coincidente con las predicciones de la _
"teoría aerobia-anaerobia".
- 12.- La aclimatación a hipoxia extrema produce un aumento del por
centaje subunidades H en el músculo caudal. Esto se ha rela
cionado con un posible retraso en el desarrollo a nivel mo-
lecular, con el descenso de actividad del músculo en hipo--
xia y con un posible papel del mismo en la eliminación del _
lactato durante la aclimatación.
- 13.- El aumento de actividad total y específica LDH que ocurre _
durante la gastrulación es concordante con los resultados

obtenidos en otras especies de anfibios. Este aumento, junto con el estudio de la localización histoquímica, apoya la hipótesis de una contribución importante del metabolismo anaerobio durante los movimientos de la gastrulación.

- 14.- En el estado de mórula, la actividad LDH se localiza fundamentalmente alrededor de los núcleos celulares. Esta disposición se ha relacionado con la localización perinuclear del glucógeno en varias especies en este estado, incluyendo a Discoglossus pictus.
- 15.- El oxamato sódico, inhibidor competitivo de la LDH, detiene el desarrollo embrionario a concentración 1mM, con un tiempo letal 50 de unos 120 a 150 minutos. El efecto es reversible y no se produce en presencia de piruvato 1mM. Estos resultados podrían significar una acción del oxamato a nivel de la LDH, poniendo de manifiesto la importancia del metabolismo anaerobio durante el desarrollo embrionario.
- 16.- La actividad total y específica LDH presenta un máximo coincidiendo con el clímax metamórfico, para descender luego al final del mismo. Este hecho se ha relacionado con el descenso en el consumo de oxígeno y la activación de la glucólisis que se da en los anfibios anuros durante este período.

BIBLIOGRAFIA

- Adams E. y C.V. Finnegan (1965). J.Exp. Zool. V.158, p.241
- Agostini A., C. Vergani y L. Villa (1966). Nature. V.209, p.1024.
- Agrell I. y B. Kjellberg (1965). Comp. Biochem. Physiol. V.16 p. 515.
- Ahuja M.R., M. Schwab y F. Anders (1975). Sep. Experientia. V 31, p.296.
- Alonso M. (1960). Bol. R.Soc. Hist. Nat. V.58, p.5.
- Alonso M. y A. Torrellas (1973). Acta Embryol. Exp. V.3, p.313.
- Alonso M., R. Bueno y J. de Costa (1976). Acta Embryol. Exp. V.3., p. 345.
- Allen J.F. y D.O. Hall (1973). Biochem. Biophys. Res. Commun. V.52, p.856.
- Allen J.M. (1961). Ann.N.Y. Acad. Sci. V.94, p.937.
- Allendorf F.W. (1973). Ms. Thesis. Univ. Washington, Seattle.
- Allendorf F.W., N. Ryman, A. Stennek y G. Stahs (1976). Hereditas. V. 83, p.73.
- Andersen H.T. (1966). Physiol. Rev. V.46, p.212.
- Anderson G.L. y R.W. Bullard (1971). Proc. Soc. Expe. Biol. Med. V. 138, p. 441
- Anderson G., G. Bengtsson, A. Albinsson, S. Rosén y O.Heby (1978). Cancer Res. V. 38, p. 3938.
- Armentrout D. y F.L. Rose (1971). Comp. Biochem. Physiol. V.39, p.447.
- Aubert H. (1881). Arch. Anat. Physiol. V.26, p.293.
- Auerbach S. y R.L. Brinster (1967). Exp. Cell. Res. V.46, p.89.
- Avers C.J. (1976). Cell Biology. (D. Van Nostrand Co.) N.Y., p.102

- Ayala F.J. y W.W. Anderson (1973). Nature. V.241, p.274.
- Baba N. y H.M. Sharma (1971). J.Cell.Biol. V,51, p.621.
- Babák E. (1907). Zentr.Physiol. V.21, p.97.
- Bailey G.S. y A.C. Wilson (1968). J. Biol. Chem. V.243,p.5843.
- Baldwin J. (1980). Proc. Aust. Biochem. Soc. V.13, p.14.
- Balek R.W., J. Snow y L. Haduck (1967). Biochem. Biophys. Res. Commun. V.6, p. 171.
- Balgooy J.N.A. y E. Roberts (1979). Comp. Biochem. Physiol. V. 62B, p.263.
- Ballard W.W.(1973). J. Exp . Zool. V.184, p.27.
- Barbieri F.D. y H. Salomón (1963). Acta Embryol. Morphol. Exp. V.6, p. 304.
- Bargiello T. y J. Grossfield (1979). Biosystems. V.11, p.183.
- Bartels H., R. Bartels, A.M. Rathschlag-Schaefer, H. Robbel y S. Ludders (1979). Resp. Physiol. V.36, p.375.
- Barth L.G. y L.J. Barth (1954). en "The Energetics of Development" Columbia Univ. Press. N.Y.
- Baur E.W y D.L. Pattie (1968). Nature (London). V.218, p.341.
- Barrie S.E. y P. Harris (1976). Am.J. Phusiol. V.231,p. 1308.
- Beamish F.W.H. (1964).Can.J. Zool. V.42, p.355.
- Beaumont (1960). Biol. Bull. Fr. Belg.V.94, p.267.
- Benet L. y M. Bochet (1963). J. Physiol. (París). V.55, p.405.
- Benesch R. y R.E. Benesch (1967).Biochem. Biophys. Res. Commun, V.26, p.162.
- Bennett A.F. y P. Licht (1973). J. Comp. Physiol. V.87, p.351.
- Bennett A.F. y P. Licht (1974). Comp. Biochem Physiol. V.48A, p. 319.

- Berger E. (1976). Amer. Natur. V.110, p.823.
- Bergmeyer H.V., E. Bernt y B. Hess (1965). en "Methods of enzymatic analysis (H.V. Bergmeyer ed.). Ac. Press, N.Y.
- Binette P., D. Praguay y A. Rekate (1977). Life Sci. V.20, p. 1809.
- Bing R.J., A. Siegel, A. Vitale, F. Balboni y E. Sparks (1953). J. Clin. Invest. V.32, p. 556.
- Bing R.J. (1965). Physiol. Rev. V.45, p. 171.
- Blanco A. y W.H. Zinkham (1963). Science V. 139, p.601.
- Blanco A., M. Gutiérrez, C.G. Henquin y N.M. G. de Burgos (1969). Science, V. 164, p. 835.
- Blanco A., C. Burgos, N.M.G. de Burgos y E.E. Montamat (1976). Biochem J. V. 153, p. 165.
- Blazka P. (1958). Physiol. Zool. V.31, p. 117.
- Blix A.S. y S.H. J. From (1971). Comp. Biochem. Physiol. V.40B, p. 579.
- Blix A.S., E.B. Messelt y S.H. From (1973). Comp. Biochem Physiol. V. 44B, p. 625.
- Boell E.J. (1948). Ann. N.Y. Acad. Sci. V.49, p. 773.
- Boell E.J., P. Greenfield y B. Hille (1963). Dev. Biol. V.7, p. 420.
- Bohr C. (1900). Skand. Arch. Physiol. V.10, p. 74.
- Bond A.N. (1960). Dev. Biol. V.2, p. 1
- Boone C.M., T.R. Chen y F.H. Ruddle (1972). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. V.69, p. 510.
- Boulekbache H.H., Ch. Devillers, A. Rosemberg y C. Joly (1969). C.R. Acad. Sci. Paris. V.268, p. 2211.

- Boulekbache H.H., Ch. Devillers, A. Rosemberg y C. Joly (1971).
C.R. Acad. Sci. París. V. 272, p. 114.
- Boulekbache H.H., P. Roubeaud, Ch. Devillers y C. Joly (1977).
C.R. Acad. Sci. París. V. 284, p. 381.
- Boulekbache H.H. y G. Barja de Quiroga (1981). Fac. Sci. París.
Próxima publicación.
- Bours J., P.I. Vassileva y O. Hockwin (1977). Ophtal. Res. V.9,
p. 201.
- Boutilier R.G. y D.P. Toews (1977). J. Exp. Biol. V.68, p.99.
- Brachet J. (1934). Arch. Biol. V. 45, p. 611.
- Brachet J. y P. Malpoix (1971). Adv. Morphog. V.2, p. 263.
- Brachet J. (1975). en "Introducción a la Embriología Molecular"
(H. Blume ed.). Madrid, p. 98.
- Branch C.L. y D.H. Taylor (1977). Comp. Biochem. Physiol. V.58A,
p. 269.
- Brinkworth R.I. y C.J. Masters (1978). Mech. Ageing Devel. V.8,
p. 69.
- Brinster R.L. (1968). J. Reprod. Fertil. V.17, p.139.
- Brinster R.L. (1973). en "Regulation of Mammalian Reproduction".
(S.J. Segal ed.) Springfield. Illionis. C.Ch. Thomas, p.302.
- Broniszewska-Ardelt B. y J.T. Wroblewski (1975). Bull.Ac. Polon.
Sci. XXIII, p.505.
- Brown D. y D. Caston (1962). Dev. Biol. V.5, p.412.
- Brown D.D. y E. Littna (1964). J. Molec. Biol. V.8, p.669.
- Brown G.W. (1964). en "Physiology of the Amphibia". (Moore J.A.
ed.). AC. Press. N.Y. Capit. 1.
- Bryant C. (1975). en "Advances in Parasitology". (B. Dawes ed.)
Ac. Press. N.Y. V. 13, p. 36.

- Butler J.A., C.E. Patterson y M.L. Rhodes (1979). Am. Rev. Resp. Dis. V.119, p. 296.
- Butler P.J. y E.W. Taylor (1975). J. Exp. Biol. V.63, p. 117.
- Cabello B., J. Lubin, A.M. Rywlin y R. Frenkel (1980). Amer. J. clin. Pathol. V.73, p. 253.
- Cahn R.D., N.O. Kaplan, L. Levine y E. Zwillling (1962). Science. V.136, p. 962.
- Callan H.G. (1952). Brit. Soc. Exp. Biol. Symposium, VI, p.243.
- Camerano L. (1883). Mem. Acc. Torino. V.35, p. 187.
- Champion M.J. y G.S. Whitt (1976). J. Exp. Zool. V.196, p.263.
- Chang S.M.T., Ch-Y. Lee y S.S.L. Li (1979). Biochem. Genetics. V.17, p. 715.
- Chanutin A. y R. Curnish (1967). Archs. Biochem. Biophys. V.121, p.96.
- Chen P.S. (1968). J. Exp. Zool. V.168, p.337.
- Chen T.R., F.A. McMorris, R. Greagan, F. Ricciuti, J. Tischfield y F. Ruddle (1973). Amer. J. Hum. Genet. V.25, p. 200.
- Chow C.K. (1976). Nature. V. 260, p.721.
- Christiansen J. y D. Penney (1973). J. Comp. Physiol. V.87, p. 237.
- Chury Z. (1952). Spisy. Lek. Fak. Masaryk. Univ. V. 25, p.23.
- Chvapil M. (1976). Life Sci. V.17, p.761.
- Claycomb W.C. y C.A. Villee (1971). Devel. Biol. V.24, p.413.
- Cohen G. y P. Hochstein (1963). Biochemistry. V.2, p.1420.
- Cohen S. (1954). J. Biol. Chem. V.211, p. 337.
- Coles G.C. (1970). Comp. Biochem. Physiol. V. 34, p. 481.

- Cornish H.H., M.L. Bartb y V.N. Dodson (1970). Toxicol. Appl. Pharmacol. V.16, p. 411.
- Corsin J., C. Joly y H.H. Boulekbache (1979). C.R. Acad. Sci. París. V. 288, p.1571.
- de Costa J. (1973). Memoria de Licenciatura. Univ. Complutense Fac. Biol. Madrid.
- de Costa J. (1978). Memoria de Tesis Doctoral. Univ. Complutense. Fac. Biol. Madrid, p. 142.
- de Costa J., A. Siguenza, G. Barja de Quiroga, M. Alonso y A. Fraile (1978). Rev. Esp. Fisiol. V. 34, p. 401.
- de Costa J., M. Alonso y A. Fraile (1979). Acta Embryol. Exp. V. 3, p. 233.
- Costello L. A. y N.O. Kaplan (1963). Biochem. Biophys. Acta. V.73, p. 658.
- Crampton J.M. y R. H. Woodland (1979). Dev. Biol. V.70, p.453.
- Crapo J.D. y D.F. Tierney (1974). Am. J. Physiol. V.226, p.1401.
- Crapo J.D., K. Sjostrom y R.T. Drew (1978). J. Appl. Physiol. V.44, p. 364.
- Daka N.J. y K.J. Laidler (1980). Biochim. Biophys. Acta. V.612, p.305.
- Dalcq A.M. (1952). Compt. Rend. Assoc. Anat. V.39, p.513.
- Darol E.D. y M.D. Faïman (1978). Biochem. J. V.174, p.769.
- Davis B.J. (1964). Ann. N.Y. Acad. Sci. V.121, p.404.
- Davis J.C. y J.N. Cameron (1971). J. Exp. biol. V. 54, p. 1.
- Dawson D.M. y N.O. Kaplan (1965). J. Biol. Chem. V.240, p.3215.
- Daxboeck C. y G.F. Holeton (1980). Comp. Biochem. Physiol. V.65C, p.117.

- Degroot N. y P.P. Cohen (1962). Biochim. Biophys. Acta V.59, p. 588.
- Delarbre Ch. , M.M. C. Lambré y J.A. Thomas (1976). C.R. Acad. Sci. París. V.282, p. 879.
- Demopoulos H.B. (1973). Fed. Proc. V. 32, p. 1903.
- D' Eon D., R.G. Boutilier y D.P. Toews (1978). Comp. Biochem. Physiol. V. 60A, p. 7.
- Deparis P., J. Beetschen y A. Jaylet (1975). Comp. Biochem. Physiol. V. 50A, p. 263.
- Deuchar E.M. (1975). En "Xenopus".(J. Wiley and sons ed.). London.
- Díaz-Flores L., G. Ortíz y G. Sánchez (1974). "Bases ultraestructurales en Citología, Histología y Anatomía Patológica (Paredes ed.). Santiago de Compostela.
- Doudoroff P. y M. Katz (1950). Sewage Ind. Wastes. V.22, p.1432.
- Douglas B.J. (1974). Lab. Invest. V.31, p. 580.
- Drastich E. (1925). Z. Vergleich Physiol. V.2, p.632.
- Dreyfus J.C., J. Demos, F. Schapira y G. Schapira (1962). C.R. Acad. Sci. París. V.254, p. 4384.
- Driedzic W. y P.W. Hochachka (1976). Am. J. Physiol. V.230, p. 579.
- Dudman N.P.B. y B. Zerner (1973). Biochem. Biophys. Acta. V. 310, p. 248.
- Dulka J.J. y T.H. Risby (1976). Analyt. Chem. V.48, p. 640A.
- Eaton J.W., T.D. Skelton y E. Berger (1974). Science. V.183, p. 743.

- Ehman J.D. y H.D. Hultin (1973). Arch. Biochem. Biophys. V.154, p. 471.
- Ellington W.R. y G.L. Long (1978). Arch. Biochem. Biophys. V. 186; p. 265.
- Emery A.E. (1968). J. Neurol. Sci. V.7, p.137.
- Emilio M.G. (1974). J. Exp. Biol. V.60, p.901.
- Engel W., J. Faust y U. Wolf (1971). Biochem. Genet. V.2, p. 127.
- Engel W., R. Kreutz y U. Wolf (1972). Biochem. Genet. V.7, p. 45.
- Engel W. y R. Kreutz (1973). Humangenetik. V. 19, p. 253.
- Engel W., J. Schmidtke, W. Vogel y U. Wolf (1973). Biochem. Genetics V.8, p. 281.
- Epstein C.J., L. Kwock y S. Smith (1971). FEBS Lett. V.13, p.45.
- Erickson R.P., H. Spielmann, F. Mangia, D.J. Tennenbaum y C.J. Epstein (1975) en "Isozymes-III" (Markert C.L. ed.). Ac. Press. N.Y., p. 313.
- Etkin W. (1934). Physiol. Zool. V.7, p. 129.
- Everse J. y N.O. Kaplan (1973). en "Avances in Enzymology", V. 37, p. 61.
- Everse J. y N.O. Kaplan (1975). en "Isozymes II". (C.L. Markert ed.). Ac. Press. N.Y., p. 29.
- Fahimi H.D. y C.R. Amarasingham (1964). J. Cell. Biol. V.22, p. 29.
- Farrar E.S. (1973). Gen. and Comp. Endocrinol. V. 21, p. 513.
- Farrell E.C., N. Baba, G.P. Brierley y H.D. Grumer (1972). Am. J. Pathol. V. 80, p.419.

- Faulhaber I. y L. Lyra (1975). Wilhelm Roux' Archiv. V.176, p. 191.
- Faulhaber I. y L. Lyra (1978). Comp. Biochem. Physiol. V.59B, p.307.
- Fawcett J.S. y C.J.O.R. Morris (1966). Separat. Stud V.1, p.9.
- Fine I.H., N.O. Kaplan y D. Kuftinec (1963). Biochemistry. V.2, p. 116.
- Fletcher K. y N.B. Myant (1959). J. Physiol. (London). V.145, p. 353.
- Forti G. (1977). Plant. Sci. L. V. 10, p. 197.
- Fottrell P.F., C.M. Spellman y E.M. O'Dwyer (1974). Cancer Res. V.34, p. 979.
- Foxon G.E. H. (1964). "Blood and Respiration". Cap. 3 en "Physiology of the Amphibia". (J.A. Moore ed.) Ac. Press. N.Y.
- Francke U., D.L. George, M.G. Brown y U.M. Riccardi (1977). Cytogenet. Cell Genet. V. 19, p. 197.
- Frank L., A.P. Autor y R.J. Roberts (1977). J. Pediatr. V.90, p. 105.
- Frank L., D. Woods y R.J. Roberts (1978). Bioch. Pharmacol. V. 27, p. 251.
- Frank L., J.R. Bucher y R.J. Roberts (1979). J. Appl. Physiol. V. 45, p. 699.
- Frank L. y D. Massaro (1980). Amer. J. Med. V.69, p. 117.
- Frankel J.S. y N.H. Hart (1977). J. Hered. V. 68, p. 81.
- Frankel J.S. (1980). Comp. Biochem. Physiol. V. 67B, p.133.
- Franzini C.A. (1970). J. Cell. Biol. V.47, p. 488.
- Fray F.E. J. y J.S. Hart (1948). Biol. Bull (W.H.) V.94, p.66.
- Fridovich I. (1975). Ann. Rev. Bioch. V.44, p. 147.

- Fridovich I. (1976). en "Free radicals in biology". (W.A. Pryor ed.). Ac. Press. N.Y., V.I, pág. 239.
- Friedman G.B. (1971). Can. J. Zool. V.49, p. 565.
- Fritz P.J. y K.B. Jacobson (1965). Biochemistry. V.4, p. 282.
- Fritz P.J., E.S. Vesell, E.L. White y K.M. Pruitt (1969). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. V.62, p. 558.
- Fritz P.J., W.J. Morrison, E.L. White y E.S. Vesell (1970). Anal. Biochem. V.36, p. 443.
- Fritz P.J., E.L. White, K.M. Priutt y E.S. Vesell (1973). Biochemistry V. 12, p. 4033.
- Fromm H.J. (1961). Biochim. Biophys. Acta. V.52, p.199.
- Funkhoser A. y K.S. Mills (1969). Physiol. Zool. V.42, p.15.
- Gabbott P.A. (1976). en "Marine Mussels". (B.L. Bayne ed.). Cambridge Univ. Press.
- Gäde G. y M. Grieshaber (1975). J. Comp. Physiol. V. 102, p.149.
- Gäde G. (1979). Comp. Biochem. Physiol. V.63B, p.387.
- Gallien C.L. (1948). Bull. Soc. Sci. Nat. Tunis. V.1, p. 80.
- Gallien C.L. y Ch. Houillon (1951). Bull. Biol. V.4, p. 1.
- Gallien C.L., F. Guillet y Ch. Aimar (1971). C.R. Acad. Sci. Paris. V. 273, p. 2630..
- Gee J. H. (1976). Can J. Zool. V. 54, p. 1030.
- Gee J.H., R.F. Tallman y H.J. Smart (1978). Can.J. Zool. V.56, p. 1962.
- Gerd G. (1979).Comp. Biochem. Physiol. V. 63B, p.387.
- Gillespie J.H. y C. Langley (1974). Genetics. V.76, p.837.
- Girard B.N. y C.L. Markert (1975). en "Isozymes II" (C.L. Mar--

- kert ed.). Ac. Press. N.Y., p. 45.
- Goldberg E. (1963). Science. V.139, p.602.
 - Goldberg E. (1966). Science. V.151, p. 1091.
 - Goldberg E. y T. Wuntch (1967). J. Exp. Zool. V.165, p.101.
 - Goldberg E. (1972). J. Biol. Chem. V.247, p. 2044.
 - Goldberg D.M. (1974). Proc. 6º- Simposio Int. Enzimol. Clin. Venecia Italia, p. 235.
 - Goldman R.D., N.O. Kaplan y T.C. Hall (1964) Cancer Res. V. 24, p. 389.
 - Goodfriend T. L. y N.O. Kaplan (1964). J. Biol. Chem. V.239, p. 130.
 - Goodfriend T.L., D.M. Sokol y N.O. Kaplan (1966). J.Mol. Biol. V. 15, p. 18.
 - Gordon A.S. (1935). Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. V. 32, p.820.
 - Gradwell N. y B. Walcott (1970). J. Exp. Zool. V. 176, p.193.
 - Graf J.D., F. Karch y M.C. Moreillon (1977). Experientia. V.33, p. 1582.
 - Grassé P.P. (1976). en "Précis de Zoologie, Vertébrés. V.II, (Masson ed).París.
 - Gregg J.R. y R. Ballentine (1946). J. Exp. Zool. V.103, p.143.
 - Gregg J.R. (1948). J. Exp. Zool. V.109, p. 119.
 - Gregg J.R. (1962). Biol. Bull. V.123, p. 555.
 - Gregg J.R., J.J. McIsaac y M.A. Parker (1964). Biol. Bull. V. 127, p.256.
 - Griffin J.H. y R.S. Criddle (1970). V.4, p. 1195.
 - Grillo T.A.I., K. Watanabe y S.B.O. Olusi (1970). IXth. Int. Cong.

- Anat. , p. 164.
- Guppy M. y P.W. Hochachka (1978). Am. J. Physiol. V. 234, p. R136.
 - Hamada M. (1975). en "Isozymes II" (C.L. Markert ed.). Ac. Press N.Y., p. 143.
 - Hammond G.L., B.N. Ginard, N.S. Talner y C.L. Markert (1976). Circulation. V.53, p. 637.
 - Hanke W. y K.H. Leist (1971). Gen. Comp. Endocrinol. V.16, p. 137.
 - Hanzlíková V. y S. Schiaffino (1977). J. Ultrastruct. Res. V.60, p.121.
 - Halliwell B. (1978a). Prog. Biophys. Mol. Biol. V. 33, p.1.
 - Halliwell B. (1978b). Cell. Biol. Int. Reports. V.2, p.113.
 - Halliwell B. (1979). Oxygen free radicals, en "Strategies of Microbial Life in Extreme Environments" (M.Shilo ed.). Berlín, p. 195.
 - Harlow H.J. (1978). Comp. Biochem. Physiol. V.61 A, p.177.
 - Harris H.(1966). Proc. Roy. Soc. London. V.B164, p. 298.
 - Harris J.P. (1953). Field Lab. V.21, p.147.
 - Haugaard N. (1968). Physiol. Rev. V.48.,p.311.
 - Heath D. y D.R. Williams (1979). en "Life at high altitude" Studies in Biology, No. 112. (E. Arnold ed.). Ltd. London.
 - Heatley N.E., y P.E. Lind-hal (1937). Proc. Roy. Soc. V.B120, p.173.
 - Helff O.M. y K.I. Stubblefield (1931). Physiol. Zool. V.4, p. 271.
 - Heezen B.C. (1957). Deep. Sea Res. V.4, p. 105.

- Hill R.W. (1976). "Comparative Physiology of Animals, an environmental approach". (Harper and Row ed.) N.Y.
- Hintz M. y E. Goldberg (1977). Dev. Biol. V.57, p.375.
- Hirway S.C. y H.O. Hultin (1977). J. Food Sci. V.42, p.1164.
- Hochachka P.W. y G.N. Somero (1973). "Strategies of Biochemical Adaptation" (W.B. Saunders Co.). Philadelphia.
- Hochachka P.W. (1975). Comp. Biochem. Physiol. V.52B, p.25.
- Hochachka P.W. y W.C. Hulbert (1978). Can. J. Zool. V.56, p.774.
- Hochachka P.W. (1980). "Living Without Oxygen, closed and open systems in hypoxia tolerance". Harvard Univ. Press. Cambridge.
- Hock R.J. (1970). "Vertebrate Structures and Function". (W.H. Freeman and Co.). San Francisco, 1974, p.195.
- Hoff-Jørgensen E. y E. Zeuthen (1952). Nature. V.169, p.245.
- Holmes R.S. y C.L. Markert (1969). Proc. Nat. Acad. Sci.U.S. V.64, p.205.
- Holmes R.S. y R.K. Scopes (1974). Eur. J. Biochem. V.43, p.167.
- Holmes R.S. (1975). en "Haemoglobin, Isoenzymes and Tissue Differentiation". (A.Neuberger y E.L. Tatum ed.).North Holland American Elsevier, p. 80.
- Holmes R.S. y C.J. Masters (1979). en "Isozymes 3" (A.R. Liss ed.) N.Y., p.92.
- Horwitt M.K. (1976). Am. J. Clin. Nutr. V.29, p.569.
- Houssais J.F. (1966). Biochim. Biophys.Acta. V.128, p.239.
- Howard J.H. y R.L. Wallace (1980). Comp. Biochem. Physiol. V. 65 A, p.243.
- Howell B., S. Mccune y R. Schaffer (1979). Clin. Chem.V.25, p. 269.

- Huff J.E., G.E. Kaufman y M. Ingram (1975). Aviat. Space Environm. Med. V.46, p.1147.
- Hughes G.M. y S.I. Umezawa (1968). J. Exp. Biol. V.49, p.565.
- Hughes G.M. e I.A. Johnston (1977). J. Physiol. V.270, p.69.
- Hultin H.O., C. Westrot y H.H. Southard (1966). Nature. V.211, p.853.
- Hultin H.O. (1975). en "Isozymes II". (C.L. Markert ed.). Ac. Press N.Y., p.69.
- Hutchinson V.H., H.B. Haines y G. Engbretson (1976). Resp. Physiol. V. 27, p.115.
- Itazawa Y. y T. Takeda (1978). Resp. Phys. V.35, p.263.
- Ito M., T. Harada, N. Baba y S. Morikawa (1973). Acta Histochem. Cytochem. V. 6, p.183.
- Izquierdo L. (1955). Arch. Biol. París. V.66, p.403.
- Jacobsen N.O. (1969). J. Histochem. Cytochem., p.250.
- Jacobsen W. (1938). J. Morphol. V.62, p.445.
- Jaeger L.C. (1945). J. Cell. Comp. Physiol. V.25, p.97.
- Job S.V. (1955). Univ. Toronto Biol. Ser. V.61, p.1.
- Johnson G. (1978). Biochem. Genetics. V.17, p.499.
- Johnson G.B. (1974). Science. V.184, p.28.
- Johnson M.S. (1971). Heredity, V.27., p.205.
- Johnston I.A. (1974). J. Fish. Biol. V.7, p.459.
- Johnston I.A. (1975). Comp. Biochem. Physiol. V.51B, p.235.
- Jones D.R. (1967). Comp. Biochem. Physiol. V.20., p.691.
- Jones D.R. (1972). J. Comp. Physiol. V.77, p.356.
- Jørgensen J.B. y T. Mustafá (1980). Comp. Biochem. Physiol. V. 67B, p.243.

- Kaplan N.O., M.M. Ciotti, M. Hamolsky y R.E. Bieber (1960).
Science V. 131, p.392.
- Kaplan N.O. y T.L. Goodfriend (1964). Adv. Enzyme Reg. V.2, p.
203.
- Kaplan N.O.(1968). Ann.N.Y.Acad.Sci. V.151,p.382.
- Kaplan N.O., J. Everse y J. Admiraal (1968). Ann. N.Y. Acad.
Sci. V.151, p.400.
- Kaplanskii A.S., G.N. Durnova y V.V. Portugalov (1973). Kosm.
Biol. Med. V.7, p.6.
- Karpati G., S. Carpenter, C. Melmed y A.A. Eisen (1974). J.
Neurol. Sci. V.23, p.129.
- Kean E.L., P.H. Adams, R.W. Winters y R.E. Davies (1961). Bio-
chim. Biophys. Acta. V.54, p.474.
- Keller A.J. y T.A. Lyerla (1977). Copeia, 1977, p.691.
- Kiesow L.A. (1977). J. Clin. Chem. Clin. Biochem. V.15, p.449.
- Kiltz H.H., W. Keil, M. Griesbach, K. Petry y H. Meyer (1977).
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. V.358, p. 123.
- Kim H.C., A. D'Iorio y W.K. Paik (1966). Can. J. Biochem.V.44,
p.303.
- Kimura M. y T. Ohta (1971). Nature. V.229, p.467.
- Kinnula V.L. (1976). Acta Physiol. Scand. V.96, p.417.
- Klag J.J. y G.A. Ubbels (1975). Differentiation. V.3., p.15.
- Klar G.T. y C. B. Stalnaker (1979). Comp. Biochem. Physiol. V.
64B, p.391.
- Klar G.T. ,C.B. Stalnaker y T.M. Farley (1979). Comp. Biochem.
Physiol. V.63A, p.229 y 237.
- Klose J., V. Wolf, H. Hitzeroth, H.Ritter, N.B.Atkin y S. Ohno
(1968). Humangenetin. V.5., p.190.

- Klose J. y H. Spielmann (1975). Biochem. Genetics. V.13, p. 707.
- Knoepffler, L.P. (1961). Tesis Doc., Fac. Sci. Univ. Paris.
- Koen A.L. y M. Goodman (1969). Biochem. Genetics. V.3, p.457.
- Koen R.K. y W.F. Eanes (1979). En "Isozymes 3". (A.R.Liss ed). N.Y., p.185.
- Kojima K. (1971). Evolution. V.25, p.281.
- Krasnow E.M., W.A. Neill, J.V. Messer y R. Gorlin (1962). J. Clin. Invest. V.41, p.2075.
- Kuffler S.W y E.M. V. Williams (1953). J. Physiol. V.121, p. 318
- Kunz Y.W.(1973). Rev. Suisse Zool. V.80, p.431.
- Kutty N. (1968). J. Fish. Res. Bd. Can. V.25, p.1689.
- Lahoud H., R.K. Prichard, W.R. McManus y P.J. Schofield (1971). Int. J. Parasitol. V.1., p.233.
- Lännergren J. y R.S. Smith (1966). Acta Physiol. Scand. V.68, p. 263.
- Lantz L.A. (1947). Proc. Roy. Soc. London. V.134B, p.52.
- Latter B.D.H. (1975). Genetics V.79, p.325.
- Laurent P.(1973). C.R. Acad. Sci. París. V.277, p.1901.
- Laurent P. (1975). J. Physiol. París. V.70, p.571.
- Lavoisier A.L. (1783). Soc. Roy. Med., Memoires de Medicine et Physique Medical. V.5., p. 569.
- Lee J. B. (1964). Proc. 5th. Conf. Kidney (J. Metcuff ed.). N.Y. Nat. Kid. Fond., p.83.
- Lehnert T. y H.H. Berlet (1979). Biochem. J. V.177, p.813.

- Lennerstrand A. (1963). Z. Vergl. Physiol. V.20., p.287.
- Levins R. (1968). en "Evolution in Changing Environments". Princeton Univ. Press. Princenton. New Jersey.
- Levy P.L. y S.N. Salthe (1971). Comp. Biochem. Physiol. V.39B, p. 343.
- Levy P.L. y S.N. Salthe (1974). Comp. Biochem. Physiol., V.47B, p.355.
- Lewis M.W. (1970). Copeia, 1970, p.319.
- Lewontin R.C. y J.L. Hubby (1966). Genetics. V.54, p.595.
- Lillo R.S. (1979). Am. J. Physiol. V.237, p.R-210.
- Lim S.T. y G.S. Bailey (1977). Biochem. Genetics. V.15, p.707.
- Lindy S. y M. Raja-Salmi (1966). Science. V.153, p.1401.
- Long G.L. y N.O. Kaplan (1968). Science. V.162, p.685.
- Long G.L. y N.O. Kaplan (1973). Archs. Biochem. Biophys. V.154, p.696.
- Long G.L. (1976). Comp. Biochem. Physiol. V.55B, p.77.
- Løvtrup S. (1959). J. Exp. Zool. V.140, p.383.
- Løvtrup S. (1978). Biol. Rev. V.53, p.1.
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.S. Randall (1951). J. Biol. Chem. V.193, p.265.
- Lucotte G. (1977). en "Le Polymorphisme Biochimique et les Facteurs de son Maintien". (Masson ed.). Paris.
- Ludwin S.K., W.H. Northway y K.G. Bensch (1974). Lab. Invest. V.31, p.425.
- Lush I.E. (1970). Comp. Biochem. Physiol. V.32, p.23.
- Lyra L., I. Faulhaber, H. Erlær y E. Kleine (1976). Comp. Biochem. Physiol. V.55B, p.31.

- Maeger M., W.F. Blatt, P.J. Natale y C.M. Blatteis (1968). Am. J. Physiol. V.215, p.8.
- Maillet M. (1975). "Abregé de Cytologie". (Masson ed.). París p. 130 y 160.
- Makkonen M., I. M. Penttila y O. Castrén (1980). Acta Obstet. Gynecol. Scand. V.59, p.97.
- Malamed S. (1958). Biol. Bull. V.114, p.226.
- Mangia F. y C.J. Epstein (1975). Dev. Biol. V.45, p.211.
- Mangia F., R.P. Erickson y C.J. Epstein (1976). Dev. Biol. V. 54, p.146.
- Markert C.L. y F.Møller (1959). Proc. Nat. Acad. Sci.US. V.45, p.753.
- Markert C.L. e I. Faulhaber (1965). J. Exp. Zool. V.159, p.319.
- Markert C.L. Y. Masui (1969). J. Exp. Zool. V.172, p. 121.
- Markert C.L. (1975). en "Isozymes I" (C.L. Markert ed.). Ac. Press. N.Y., p.1.
- Markert C.L., J.B. Shaklee y G.S. Whitt (1975). Science. V.189, p.102.
- Marshall M.J., F.E. Neal y D.M. Goldberg (1979). Brit. J. Cancer. V.40, p.380.
- Massaro E.J. y C.L. Markert (1968). J. Exp. Zool. V.168, p.223.
- Masters C.J. y R.S. Holmes (1975). en "Haemoglobin, Isoenzymes and Tissue Differentiation". (A. Neuberger ed.). North. Holland American Elsevier.
- Masters C.J. (1978). Mech. Ageing Develop. V.7, p.455.
- McCord J.M., B.B. Keele e I. Fridovich (1971). Proc. Nat. Acad. Sci. V.68, p.1024.

- McCutcheon F.H.(1936). J. Cell. Comp. Physiol. V.8, p.63.
- McCutcheon F.H. y F.G. Hall (1937). J. Cell. Comp. Physiol. V. 9, p.191.
- Mckenzie D. y A.R. Henderson (1974). Clin. Chem. V.20, p.1462.
- McMillan P.J. (1967). J. Histochem. Cytochem. V.15, p.21.
- Melnick R.L. y H.O. Hultin (1973).J. Cell. Physiol. V.81, p. 139.
- Mendelssonh H y H.Steinitz (1943). Copeia,1943,p.231.
- Merritt R.B.(1972). The Amer. Naturalist. V.196, p. 173.
- Messelt E.B. y A.S. Blix (1976). Comp. Biochem. Physiol. V.53B. p.77.
- Milsom W.K. y D.R. Jones (1977). Separ. Exper. V.33, p.1167.
- Montamat E.E. y A. Blanco (1976). Exp.Cell. Res. V.103, p.241
- Morrison W.J. y J.E. Wright (1966). J. Exp. Zool. V.163, p.259.
- Morrison W.J. (1970). Trans. Am. Fish. Soc. V.99, p.193.
- Moyer F.H., C.B. Speaker y D.A. Wright (1968). Ann. N.Y. Acad. Sci. V.151, p.650.
- Musick W.D.L. y M.G. Rossmann (1971). J. Biol. Chem. V.254., p. 7621.
- Mustafá M.G. y D.F.Tierney (1978). Am. Rev. Respir. Dis. V. 118, p. 1061.
- Nakano E. y M. Hasegawa (1971). Devel. Growth Differ. V.13, p. 351.
- Nance W.E., A. Claflin y O. Smithies (1963). Science V.142, p. 1075.
- Nedham J. (1932). Proc. Roy. Soc. V.B-112, p.114.
- Neil E.,L.Strom y Y. Zotterman (1950).Acta Physiol.Scand.V.20, p.338.

- Neter J. y W. Wasserman (1976). (R.D. Irwin, INC). 6a. ed.
Homewood, Illinois.
- Nishikimi M., N.A. Rao y K. Yagi (1972). Biochem. Biophys. Res.
commun. V.46, p.849.
- Nohl H. y D. Hegner (1978). Eur. J. Biochem. V.82, p.563.
- Novoa W.B., A.D. Winer, A.J. Glaid y G.W. Schwert (1959). J.
Biol. Chem. V.234, p.1143.
- Odense P.H., T.C. Leung, T.M. Allen y E. Parker (1969). Bio--
chem. Genet. V.3, p.317.
- Odense P.H. y T.C. Leung (1975). en "Isozymes III". (C.L. Mar-
kert ed.). Ac. Press, N.Y., p.485.
- Odense P.H., C.M. Morrison y P. Rombough (1978). Can J. Zool.
V.56, p.2312.
- Ogihara M. (1975). en "Isozymes II" (C.L. Markert ed.). Ac. Press
N.Y., p.157.
- Ohel O. y M. Katz (1979). Am. J. Obstetr. Gynecol. V.135, p.149.
- Ohno S., V.Wolf y N.B. Atkin (1968). Hereditas. V.59, p.169.
- Ohno S. (1970). "Evolution by Gene Duplication". Springer- Verlag.
Heidelberg.
- Ornstein L. (1964). Ann. N.Y. Acad. Sci. V.121, p.321.
- Otero C., R. Brabo, C. Rodríguez, B. Paz y J.E. Allende (1978).
Dev. Biol. V.63, p.213.
- Ouedraogo M.L. y M.T. Ch.- Le Foulgoc (1973) C.R. Acad. Sci. Pa-
ris. V.276, p.1749.
- Packer L. y K. Fuehr (1977). Nature V.267, p.423.
- Page L.M. y G.S. Whitt (1973): Comp. Biochem. Physiol. V.44B, p.
611.

- Page S.G. (1965). J. Cell. Biol. V.26, p.477.
- Palcich L. (1957). Bolletino di Zoologia V. XXIV, p.609.
- Papaconstantinou J. y S.P. Colowick (1961). J. Biol. Chem. V. 236, p.278.
- Pasteels J. (1936). Arch. Biol. V.47, p.252.
- Peachey L.D. y A.F. Huxley (1962). J. Cell. Biol. V.13, p.177.
- Pelouch V., B. Ošťádal., D. Urbanová, J. Prochazka, J. Ressler y J. Widimsky (1980). Physiologica Bohemoslovaca. V.29, p.313.
- Penney D.G. (1974). Biochim. Biophys. Acta V. 358, p.21.
- Peris B. (1977). Memoria de Licenciatura. Fac. Biol. Univ. Complutense. Madrid.
- Pesce A., T.P. Fondy, F.E. Stolzenbach, D. Castillo y N.O. Kaplan (1967). J. Biol. Chem. V.242, p.2151.
- Philipp D.P. y G.S. Whitt (1977). Dev. Biol. V. 59, p.183.
- Place A.R. y D.A. Powers (1978). Biochem. Genetics. V.16, p.577.
- Plageman P.G.W., K.F. Gregory y F. Wroblewski (1960). J. Biol. Chem. V.235, p.2288.
- Pokrovsky A.A. y K.A. Kornikov (1969). Vop. Med. Khimii. V.15, p. 382.
- Ponti V., M.V. Dianzani, K. Cheeseman y T.F. Slater (1978). Chem. Biol. Interactions. V.23, p.281.
- Powell J.R. (1975). en "Isozymes IV" (C.L. Markert ed.). Ac. Press N.Y., p.9.
- Prasad R., N. Prasad y S.S. Tevethia (1972). Science. V.178, p. 70.
- Prasad R., M.M. Romsdahl., C.R. Shaw, D.M. Mumford y J.L. Smith (1974). Cancer Res. V. 34, p.1435.

- Prasad R., A. Werch y R.H. Kaufman (1977). Am. J. Obst. Ginecol. V. 129, p.104.
- Pullin R.S., D.J. Morris, C.R. Bridges y R.J.A. Atkinson (1980). Comp. Biochem. Physiol. V.66A, p.35.
- Putnam R.W. (1979). Physiol. Zool. V.52, p.509.
- Rabow L., B. Hebbe y G. Liedén (1971). Acta Chir. Scand. V.137, p.305.
- Rabow L. (1972). Scand. J. Rehab. Med. V.4, p.90.
- Rabow L. y G. Tibbling (1975). Acta Neurochir. V.32, p. 199.
- Rabow L. y K. Kristenson (1976). Acta Neurochir. en "Linkoping Univ. Medical Dissertations". V.41, p.1 .
- Randall D.J. y G. Shelton (1963). Comp. Biochem. Physiol. V.9, p.229.
- Randall D.J., G. F. Holeton y E.D. Stevens (1967). J. Exp. Biol. V.46, p.339.
- Randall D.J. (1977). en "Animal Physiology" (R.O. Eckert ed.). Chap. 14.
- Rapola J. y O. Koskimies (1967). Science V.157, p.1311.
- Rethoré M.O., J.C. Kaplan, C. Junieon, J. Cruveiller, B. Dutrillaux, A. Aurias, S. Carpentier, J. Lafourcade y J. Lejeune (1975). Ann. Genet. V.18, p.81.
- Rethoré M.O., C. Junien, A. Aurias, J. Couturier, B. Dutrillaux, J. C.Kaplan y J. Lejeune (1980). Ann. Genet. V.23, p.35.
- Reverberi G. (1964). Rev. Suisse Zool. V.71, p.203.
- Riggs A. (1951). J.Gen. Physiol. V.35, p.23.
- Robertson F.W. y E.C.R. Reeve (1952). Nature. V.170, p.286.

- Roofe P.G. (1961). Anat. Rec. V.140, p.337.
- Rose F.L. y R.B. Drotman (1967). J. Exp. Zool. V.166, p.427.
- Rose F.L., D. Armentrout y P. Roper (1971). Herpetologica. V.27, p.101.
- Roubaud P., H.H.Boulekbache, Ch. Devillers y C. Joly (1976). C.R. Acad. Sci. París. V.283, p.1543.
- Sacks J., R.V. Ganslow y J.T. Diffes (1954). Amer. J. Physiol. V.177, p.113.
- Salthe S.N., O.P. Chilson y N.O. Kaplan (1965). Nature. V.207, p.723.
- Salthe S.N. (1965). Comp. Biochem. Physiol. V.16, p.393.
- Salthe S.N. (1969). Biochem. Genet. V.2, p.271.
- Salthe S.N. y E. Nevo (1969). Biochem. Genet. V.3, p.335.
- Salthe S.N. y J.S. Mecham (1974). en "Physiology of the Amphibia-II" (B. Lofts ed.). Ac. Press. N.Y. London.
- Salthe S.N. (1975). en "Isozymes IV". Ac. Press N.Y., p.665.
- Salvat (1968). "Enciclopedia de Ciencias".V.5, p.134.
- Sarkweather W.H., L. Cousineau, H.K.Schoch y C.J. Zarafonitis (1965). Blood. V.26, p.63.
- Sasaki F. (1973). Zool. Mag. V.82, p.244.
- Sasaki F. (1974). Acta Histochem. Cytochem. V.7, p.239.
- Sasaki F. (1977). Acta Histochem. Cytochem. V. 10, p.413.
- Sasaki F. (1979). Acta Histochem. Cytochem. V.12, p.125.
- Sassaman C. y R.M. Yoshiyama (1979). The J. Heredity. V.70, p. 329.
- Satchell G.H. (1961). J. Exp. Biol. V.38, p.531.

- Satchell G.H. (1971). "Circulation in Fishes". Cambridge Univ. Press.
- Savage R.M. (1935), Linn. Proc. Zool. Soc. (Lond.). p.605.
- Schmidt-Nielsen (1976). "Fisiología Animal". (Omega ed.). Barcelona.
- Schoenenberger G.A. y E.C. Wacker (1966). Biochemistry. V.5, p. 1375.
- Scholander P.F., L. Irving y S.W. Grinell (1942). J. Biol. Chem. V.142, p.431.
- Schöttler U. y G. Wienhausen (1981). Comp. Biochem. Physiol. V.68B, p.41.
- Schroeder J., R. Upson y M. Chvapil (1975). Exp. Cell. Res. V. 94, p.227.
- Schultz G.A. y L.W. Browder (1975). Biochem. Genet. V.13, p.663.
- Schulz H. (1958). Beitrage Zur Pathol. Anat. V.119, p.45.
- Schwab M., M.R. Ahuja y F. Anders (1976). Comp. Biochem. Physiol. V.54B, p.197.
- Schwantes A.R., M.L. B. Schwantes y W. Becak (1969). Rev. Bras. Pesquisas Med. Biol. V.2, p.41.
- Selander R.K., W.G. Hunt y S.Y. Yang (1969). Evolution. V.23, p.379.
- Selander R.K. (1976). en "Molecular Evolution" (F.J. Ayala ed.). Sinauer Assoc. INC, Massachusetts.
- Sensabaugh G.F. y N.O. Kaplan (1972). J. Biol. Chem. V.274, p. 585.
- Sentein P. (1976). Microscopica Acta. V.78, p.427.
- Seymour R.S. (1973). Copeia. V.1, p.103.

- Shaklee J.B., K.L. Kepes y G.S. Whitt (1973). J. Exp. Zool. V. 185, p.217.
- Shaklee J.B., M.J. Champion y G.S. Whitt (1974). Dev. Biol. V. 38, p.356.
- Shaklee J.B., J.A. Christiansen, B.D. Sidell, C.L. Prosser y G.S. Whitt (1977). J. Exp. Zool. V.201, p.1
- Shaklee J.B. (1975). en "Isozymes I" (C.L. Markert ed.). Ac. Press. N.Y., p. 101.
- Shaw C.R. y E. Barto (1963). Proc. Nat. Acad. Sci.U.S. V.50, p. 211.
- Shekhtman A.B. (1978). Vaprosi Virusologii. V.5, p.602.
- Sherr C.J. (1968). J. Exp. Zool. V.169, p.287.
- Shertzer H.G. y J. Cascarano (1972). Amer. J. Physiol. V.223, p. 632.
- Short S., E. W. Taylor y P.J. Butler (1979). J. Comp. Physiol. V. 132, p.289.
- Shoubridge E.A., J.E. Carscaden y W.C. Legett (1976). Comp. Biochem. Physiol. V.53B, p.357.
- Shoubridge E. y P.W. Hochachka (1979). Int. Congr. Biochem. V. 13, p.R-123.
- Shows T.B., E.J. Massaro y F.H. Ruddle (1969). Biochem. Genetics V.3, p.525.
- Skilleter D.N. y E. Kun (1972). Arch. Biochem. Biophys. V.152, p. 92.
- Simkiss K. (1968). Amer. J. Physiol. V.214, p.627.
- Simon L.M., E.D. Robin, R.E. Elsner, A. Vankessel y J. Theodore (1974). Comp. Biochem. Physiol. V.47, p.209.

- Smith C.H. y J.M. Kissane (1963). Devel. Biol. V.8, p.151.
- Smith M.J. y A.G. Heath (1980). Comp. Biochem. Physiol. V.66B, p.267.
- Somer H., M. Donner y J. Murros (1973). Arch. Neurol. V.29, p. 543.
- Springell P.H. y Lynch T.A. (1976). Anal. Biochem. V.74, p.251.
- Stamato T.D. y C. Jones (1977). Somatic Cell Genetics. V.3, p. 639.
- Stambaugh R. y D. Post (1966). J. Biol. Chem. V.241, p.1462.
- Stenger V.G. y T.H. Maren (1974). Comp. Gen. Pharmacol. V.5, p. 23.
- Stinson S. (1980). Am. J. Phys. Anthropol. V.52, p.377.
- Storey K.B. (1977). Comp. Biochem. Physiol. V.56B, p.181.
- Stuart L.C. (1951). Copeia, 1951, p.220.
- Sze L.C. (1953). J. Exp.Zool. V.122, p.577.
- Szymura J.M. y A. Swies (1979). Genet. Polonica. V.20, p.415.
- Takamoto K. (1968). Zool. Mag. V.77, p.185.
- Tappel A.L. (1973). Fed. Proc. V.32, p.1870.
- Taylor A.C. y J.J. Kollros (1946). Anat. Rec. V.94, p.7.
- Taylor S.S., S.S. Oxley, W.S. Allison y N.O. Kaplan (1973). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. V.70, p.1790.
- Taylor E.W., S. Short y P.J. Butler (1977). J. Exp. Biol. V.70, p.57.
- Tereschenko I.P., V.I. Boikova y S. Zaretskaya (1975). Biulet. Experimentalnaya Baiología. V.12, p.76.
- Thorogood P.V. y B.K. Hall (1976). J. Embr. Exp. Morph. V.36, p. 305.

- Tomilin A.G. (1967). Cetacea IX.
- Tramer E.J. (1977). Am. Midl. Nat. V.97, p.469.
- Trinkaus J.P. (1973). Dev. Biol. V.30, p.68.
- Tsygankov A.P., L.N. Bandurko y L.B. Tsodikova (1971). Arkh. Pat. V.33, p.73.
- Ultsh G.R. (1976). en "Respiration of Amphibious Vertebrates". (Hughes G.M. ed.). Ac. Press. London, p.287.
- Urbani E. (1962). Advan. Morphogenesis. V.2, p.61.
- Utter F.M. y H.O. Hodgins (1969). J. Exp. Zool. V.172, p.59.
- Utter F.M. y H.O. Hodgins (1972). Trans. Am. Fish. Soc. V.101, p.494.
- Valero P., M. Alonso, J. de Costa y B. Peris (1977). III Biental de la Real Sociedad Española de Historia Natural. Granada.
- Vandenheuvel F.A. (1963). J. Am. Chem. Soc. V.40, p.455.
- Van der Laarse A., H.A. Davids, L. Hollaar, E.J. M. Van der Valk, S.A.G.J. Witteveen y W.Th. Hermens (1979). Brit. Heart J. V.41, p.66D.
- Varughese K.J., N.B. Schwartz y H. Ankel (1977). J. Biol. Chem. V.252, p.6707.
- Vergnes H., P.R. Moret y F. Duchosal (1976). Enzyme. V.21, p.66.
- Vesell E.S. (1965). Science V.150, p.1590.
- Vesell E.S. y P.E. Pool (1966). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. V.55, p.756.
- Vesell E.S. (1975). en "Isozymes II". (C.L. Markert ed.). Ac. Press. N.Y., p.1.
- Viono-Yasenetskii, A.V. (1960). Clearing House Fed. Sci. Tech. Inf. (Springfield, TT-6--51068).

- Vogel P. y P.S. Chen (1976). *Experientia*. V.32, p.304.
- Vonwyl E. y M. Fischberg (1980). *J. Exp. Zool.* V.211, p.281.
- Vos J., F. Bernaerts, I. Gabriels y W. Decleir (1979). *Comp. Biochem. Physiol.* V.62A., p.545.
- Wachsmuth E.D., G. Pfeleiderer y T. Wieland (1964). *Biochem Z.* V.340, p.80.
- Wachtlová M., V. Marš y B. Ošťádal (1977). *Virchows Arch. B. Cell. Path.* V.24, p.335.
- Waddington C.H., J. Needham y J. Brachet (1936). *Proc. Roy. Soc.* V.B120, p.173.
- Wade M. y F.L. Rose (1972). *Copeia*, 1972, p.889.
- Walden R. y C.M. Schiller (1980). *Biol. Neonate*. V.38, p.146.
- Waldovgel H. (1965). *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org.* V.156, p. 20.
- Wall D.A. y A.W. Blacker (1974). *Dev. Biol.* V.41, p.97.
- Wallace R.A., R.A. Deufel y Z. Misulovin (1980). *Comp. Biochem. Physiol.* V.65B, p.151.
- Warburg O. (1956). *Science* V.123, p.309.
- Ward R.T. (1962). *J. Cell. Biol.* V.14, p.303.
- Wares W.D. y R. Igram (1979). *Comp. Biochem. Physiol.* V.62A, p. 351.
- Wassersug R.J. y E.A. Seibert (1975). *Copeia*, 1975, p.86.
- Watanabe K. (1969). *Acta Anat. Nippon*. V.44, p.80.
- Watanabe K. y F. Sasaki (1974). *Cell. Tiss. Res.* V.155, p.321.
- Weber R.E., G. Lykkeboe y K. Johansen (1975). *Life Sci.* V.17, p. 1345.

- Weber R.E., S.C. Wood y B.J. Davis (1979). Comp. Biochem. Physiol. V.62A., p.125.
- Weigmann D.L. y R.Altig (1975). Comp. Biochem. Physiol. V.50A, p. 681.
- Wenz L., G. Duaneg y D. Acosta (1975). Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. V.12, p.173.
- Wheat T.E. y E. Goldberg (1975). en "Isozymes III". (C.L. Markert ed.). Acad. Press. N.Y., p.325.
- Wheat T.E. y E. Goldberg (1977). J. Exp. Zool. V.202, p.425.
- Whitt G.S. (1970). J. Exp. Zool. V.175, p.1.
- Wiebe A.H. y A.M. McGavock (1932). Trans. Am. Fish. Soc. V.62, p.267.
- Wieme R.J. y Y. Van Maercke (1961). Ann. N.Y. Acad. Sci. V.94, p.898.
- Wijhe M. , M.C. Blanchaer y W.R. Jacyk (1963). J. Histochem. Cytochem. V.11, p.505.
- Wilkinson J.H. y S.J. Walter (1972). Enzyme. V.13, p.170.
- Wilson A.C., N.O. Kaplan, L. Levine, A. Pesce, M. Reichlin y W.S. Allison (1964). Fed. Proc. V.23, p.1258.
- Wilson F.R., G.S. Whitt y C.L. Prosser (1973). Comp. Biochem. Physiol. V.64B, p.105.
- Wintrebert P. (1933). Archs. Zool. Exp. Gen. V.75, p.501.
- Woerdeman M.W. (1933a). Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Proc. V.36, p.189.
- Woerdeman M.W. (1933b). Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Proc. V.36, p.423.

- Wolf S.L. (1972). "Biology of the Cell". Wadsworth Pub. Co. Belmont C.A., p.68.
- Wolvekamp H.P. (1932). Z. Vergleich Physiol. V.16, p.1.
- Wood S.C. y K. Johansen (1972). Nature New Biology. V.237, p.278.
- Wood S.C. (1980). Amer. Zool. V.20, p.163.
- Woodring J.P., C.W. Clifford, R.M. Roe y B.R. Beckman (1978). J. Insect. Physiol. V.24, p.499.
- Wright D.A. (1964). Am. Zool. V.4, p.397.
- Wright D.A. y F.H. Moyer (1966). J. Exp. Zool. V.163, p.215.
- Wright D.A. y F.H. Moyer (1968). J. Exp. Zool. V.167, p.197.
- Wright D.A. y F.H. Moyer (1973). Comp. Biochem. Physiol. V.44B., p.1011.
- Wright D.A. (1975). en "Isozymes IV". (C.L. Markert ed.). Ac. Press N.Y., p.649.
- Wright J.E., J.R. Heckmann y L.M. Atherton (1975). en "Isozymes III" (C.L. Markert ed.). Ac. Press. N.Y., p.375.
- Wroblenski F. y K.F. Gregory (1961). Ann. N.Y. Acad. Sci. V.94, p.912.
- Wuntch T., E.S. Vesell y R.F. Chen (1969). J. Biol. Chem. V.244, p.6100.
- Wuntch T. y E. Goldberg (1970). J. Exp. Zool. V.17, p.233.
- Wuntch T., R.F. Chen y E.S. Vesell (1970). Science V.167, p.63.
- Yam J., L. Frank y R.J. Roberts (1978). Pediatr. Res. V.12, p.115.
- Yamamura K., Z. Ogita y C.L. Markert (1979). J. Exp. Zool. V.208, p.271.

- Yamashita S., N. Yamamoto y K. Yasuda (1970). Acta Histochem. Citochem. V.12, p.125.
- Yamawaki H. y H. Tsukuda (1979). Comp. Biochem. Phys. V.62B, p.89.
- Yasmineh W.G., G.A. Ibrahim, M. Abbasnezhad y E.A. Awad (1978). Clin. Chem. V.24, p.1985.
- Yorio T., E. Cruz y P.J. Bentley (1979). Comp. Biochem. Physiol. V.62B, p.123.
- Zinkham W.H., A. Blanco y L. Kupchyk (1964). Science, V.144, p.1353.
- Zinkham W.H. (1969). Science V.164, p.185.
- Zinkham W.H., I. Isensee y J.H. Renwick (1969). Science. V.164, p.185.